



Sveučilište u Zagrebu
PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET
Kemijski odsjek

Vida Petrušić

Analiza krema i masti nepoznatog sastava

Diplomski rad

predložen Kemijskom odsjeku
Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu
radi stjecanja akademskog zvanja
magistre kemije

Zagreb, 2019. godina.

Ovaj diplomski rad izrađen je u Zavodu za analitičku kemiju Kemijskog odsjeka
Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu pod mentorstvom prof. dr. sc
Predraga Novaka

Zahvale

Zahvaljujem prof. dr. sc. Predragu Novaku, prijatelju i profesoru na beskrajnoj podršci, vremenu i savjetima koje mi je posvetio. Hvala Vam što ste vjerovali u mene!

Svojim roditeljima na ljubavi kojom me obasipaju, stalnoj podršci i pomoći.

Najviše hvala mojoj kćerki koja je dala smisao mome životu i naučila me što znači voljeti

Sadržaj

SAŽETAK.....	<u>VIVIII</u>
ABSTRACT	<u>VIIIIX</u>
§ 1. UVOD.....	1
§ 2. LITERATURNI PREGLED	2
2.1. Tehnike za analizu i identifikaciju farmaceutskih oblika	2
2.2. Psorijaza.....	10
2.3. Kortikosteroidi i nesteroidni protuupalni lijekovi	12
2.4. Polučvrsti pripravci za lokalnu primjenu.....	15
§ 3. EKSPERIMENTALNI DIO	<u>1716</u>
3.1. Spektrometrija u području UV	<u>1716</u>
3.2. Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti obrnutih faza, RP-HPLC.....	<u>1817</u>
3.3. Metoda LC-MS	<u>1918</u>
3.4. Infracrvena spektroskopija	<u>1918</u>
§ 4. REZULTATI I RASPRAVA	<u>2019</u>
4.1. Infracrvena spektroskopija	<u>2019</u>
4.2. Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti obrnutih faza, RP-HPLC.....	<u>3331</u>
4.3. Metoda LC-MS	<u>3734</u>
4.4. Spektrometrija u području UV	<u>3835</u>
§ 5. ZAKLJUČAK	<u>4037</u>
§ 6. POPIS OZNAKA, KRATICA I SIMBOLA.....	<u>4239</u>
§ 7. LITERATURNI IZVORI.....	<u>4340</u>
§ 8. DODATAK	XV
§ 9. ŽIVOTOPIS	XVIII



Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Kemijski odsjek

Diplomski rad

SAŽETAK

Analiza krema i masti nepoznatog sastava

Vida Petrušić

U ovom radu su za određivanje sastava uzoraka krema i masti indicirane za liječenje psorijaze primjenjene vibracijska spektroskopija, tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti i spektrofotometrija u ultraljubičastom i vidljivom području. Na temelju analize snimljenih spektara IR u uzorku kreme 1 potvrđena je prisutnost kortikosteroida kao aktivne tvari, a u uzorku 2 prisutnost salicilne kiseline. Na temelju usporedbe spektara i asignacije identificirane su nosive tvari u oba uzorka, belobaza za uzorak 1 i vazelin za uzorak 2. Nadalje, korištenjem tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti određena su retencijska vremena aktivnih komponenti komercijalnih masti i krema. Usporedba kromatograma uzoraka 1 i 2, upućuje na prisutnost kortikosteroida betametazona u uzorku 1, dok je za uzorak 2 potvrđena prisutnost salicilne kiseline. Spektri LC-MS potvrdili su navedene spojeve u uzorcima. Otapanjem matrica vazelina i belobaze u propan-1-ol-u napravljeni su preliminarni baždarni dijagrami sa ciljem mogućnosti kvantitativnog određivanja količine matrica u uzorku.

(44 stranica, 30 slika, 1 tablica, 24 literaturna navoda, jezik izvornika: hrvatski)

Rad je pohranjen u Središnjoj kemijskoj knjižnici Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, Horvatovac 102a, Zagreb i Repozitoriju Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu

Ključne riječi: kreme, masti, psorijaza, HPLC, spektroskopija IR, LC-MS spektroskopija, UV-VIS spektroskopija

Mentor: prof. dr. sc. Predrag Novak

Ocjenitelji:

1. prof. dr. sc. Predrag Novak
 2. izv. prof. dr. sc. Željka Soldin
 3. izv. prof. dr. sc. Ines Primožić
- Zamjena: doc.dr.sc. Ivica Đilović

Datum diplomskog ispita: 25.veljače. 2019.



University of Zagreb
Faculty of Science
Department of Chemistry

Diploma Thesis

ABSTRACT

Analysis of ointments and creams of unknown composition
Vida Petrušić

Vibrational and UV spectroscopies and high performance liquid chromatography (HPLC) have been used to determine active components in ointment and cream samples. On the basis of IR spectral analysis the presence of corticosteroids has been detected in the sample 1 while salicylic acid has been found in the sample 2. Furthermore, belobase matrix has been detected in the sample 1 and vaseline in the sample 2. These findings have been confirmed by the HPLC and LC-MS analyses which revealed betamethasone as the active compound in the sample 1 and salicylic acid in the sample 2. By using UV spectroscopy in propan-1-ol calibration diagram for quantitative determination of matrices have been constructed. (44 pages, 30 figures, 1 table, 24 references, original in Croatian)

Thesis deposited in Central Chemical Library, Faculty of Science, University of Zagreb, Horvatovac 102a, Zagreb, Croatia and in Repository of the Faculty of Science, University of Zagreb

Keywords: cream, ointments, psoriasis, HPLC, IR spectroscopy, LC-MS spectroscopy, UV-VIS spectroscopy,

Mentor: Dr. Predrag Novak, Professor

Reviewers:

1. Dr. Predrag Novak, Professor
 2. Dr. Željka Soldin, Associate Professor
 3. Dr. Ines Primožič, Associate Professor
- Substitute: Dr. Ivica Đilović, Assistant Professor

Date of exam: 25th February 2019

§ 1. UVOD

Psorijaza je kronična kožna bolest koja se manifestira različitim kliničkim oblicima. Temeljna promjena u psorijazi je oštro ograničeno žarište prekriveno srebreno-bijelim ljuskama. Najčešće zahvaćena područja kože su laktovi, vlasište, koljena i sakralno područje. Uzrok nastanka nije u cijelosti poznat, te se pretpostavlja da bolest nastaje međudjelovanjem genetskih, vanjskih i imunoloških čimbenika. Od psorijaze u svijetu boluje 2-3%, a u Hrvatskoj 1.6% pučanstva. Psorijaza se danas smatra multisustavnom bolešću koja uz kožu može zahvatiti i mnoge druge organske sustave. Kod bolesnika koji boluju od psorijaze postoji povećani rizik od drugih bolesti kao što su anksioznost, depresija, kardiovaskularne bolesti i Chronova bolest. Psorijaza općenito narušava kvalitetu života.

Cilj ovog rada je analiza uzoraka krema i masti nepoznatog sastava koji su bili indicirani na psorijazu. U tu svrhu na početku samog istraživanja potrebno je razviti sustav otapala u kojem su kreme i masti najbolje topljivi. Za daljnju analizu i određivanje nepoznatih sastojaka krema i masti koristit će se kromatografija visoke djelotvornosti (HPLC), spektroskopija UV-VIS i spektroskopija IR. Paralelno će se snimati uzorci poznatog sadržaja u svrhu usporedbe s uzorcima nepoznatog sadržaja. Na temelju usporedbe snimljenih spektara uzoraka poznatog sadržaja sa spektrima uzoraka nepoznatog sadržaja pokušat će se analizirati aktivna komponenta i sastav krema i masti.

§ 2. LITERATURNI PREGLED

2.1. Tehnike za analizu i identifikaciju farmaceutskih oblika

2.1.1. Spektroskopija UV-VIS

Elektronska spektroskopija ili spektroskopija u ultraljubičastom i vidljivom području proučava prijelaze u molekuli uslijed pobude elektromagnetskim zračenjem valnih duljina 200-800 nm. Većina molekula se pri sobnoj temperaturi nalazi u osnovnom elektronskom stanju. Elektroni vanjskih ljuski u osnovnom stanju popunjavaju vezne (σ , π) odnosno nevezne (n) orbitale. Apsorpcijom elektromagnetskog zračenja, mogu prijeći u viša elektronska stanja, popuniti protuvezne orbitale i nakon toga vratiti se u osnovno stanje. Prolaskom zračenja kroz uzorak dolazi do djelomične apsorpcije zračenja, propušteno zračenje detektira se detektorom UV-VIS. Detektor UV-VIS pretvara intenzitet zračenja u električni signal. Apsorbancija (A) je mjera za apsorpciju, te je prema Beer-Lambertovom zakonu proporcionalna koncentraciji (c) :

$$A = \varepsilon c b \quad (1)$$

ε je molarni apsorpcijski koeficijent

b je duljina puta zračenja kroz uzorak

Apsorpcijski spektar predstavlja ovisnost apsorbancije o valnoj duljini. U ultraljubičastom ili vidljivom području naziva se spektar UV-VIS. Za apsorpciju u području UV-VIS odgovorni su kromofori. Kromofori su nezasićene organske funkcijske skupine. Konjugacija, otapalo i prisutnost auksokroma mogu povećati (hiperkromni efekt) odnosno smanjiti (hipsokromni efekt) intenzitet apsorpcijskog zračenja te ga pomaknuti prema manjim (plavi ili hipsokromni pomak) ili većim (crveni ili batokromni pomak) valnim duljinama. Auksokromi su funkcijske skupine vezane za kromofore koje utječu na položaj i intenzitet njegovog apsorpcijskog maksimuma. Dodatak auksokroma uzrokuje crveni pomak te hiperkromni efekt za prijelaze $\pi \rightarrow \pi^*$ te plavi pomak za $n \rightarrow \pi$. Navedeni efekti dovode do smanjenja razlike u energijama π i π^* orbitala uz istodobno povećanje razlike u energiji n i π^* orbitala.¹

Apsorpcijske vrpce konjugiranih kromofora koje odgovaraju prijelazima $\pi \rightarrow \pi^*$ pomaknute su prema većim valnim duljinama uz pojavu hiperkromnog efekta. Pomak apsorpcijskog maksimuma prema manjim valnim duljinama može se objasniti smanjenjem energije protuvezne orbitale (π). Konjugacijom dodatnih kromofora povećava se molarni apsorpcijski koeficijent, a maksimum apsorpcije se pomiče prema vidljivom području spektra. Povećanjem polarnosti otapala može se uzrokovati plavi pomak vrpce koje odgovaraju prijelazima $n \rightarrow \pi$. Ovaj pomak uzrokovan je smanjenjem energije n orbitale koji dovodi do povećanja razlike u energijama n i π^* orbitala. Vrpce koje odgovaraju prijelazima $\pi \rightarrow \pi^*$ pomaknute su prema većim valnim duljinama (crveni pomak), to je rezultat smanjenja energije π^* orbitale u odnosu na π orbitalu. Analizirana tvar u spektru UV-VIS može imati jedan ili više apsorpcijskih maksimuma. Na temelju položaja i inteziteta apsorpcijskog maksimuma mogu se dobiti informacije o konjugaciji spoja i prisutnosti kromofora. Prednost elektronske spektroskopije su njezina robustnost, jednostavnost, osjetljivost i brzina. Najveći nedostatak je ograničena količina kvalitativnih informacija, pa se ona najviše koristi u kvantitativnoj analizi.¹

2.1.2. Vibracijska spektroskopija

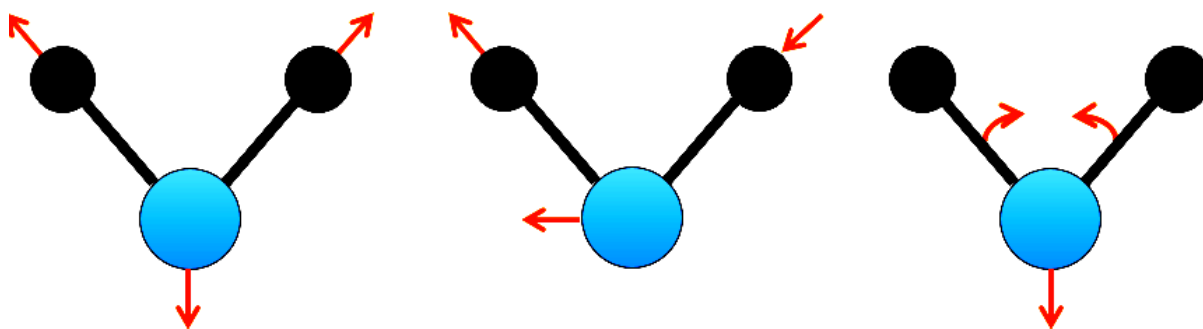
Vibracijska spektroskopija koristi se za identifikaciju molekula na temelju njihovih vibracija. Do apsorpcije zračenja dolazi u infracrvenom području, 10^{11} - 10^{14} Hz. Primjenjiva je za polarne molekule kod kojih se prilikom vibracija atoma u molekuli mijenja ili nastaje dipolni moment. Morseovom funkcijom može se opisati ovisnost vibracije molekule o udaljenosti između atoma. Vibracijske razine su diskretne, a razlika između njih se zbog anharmoničnosti porastom energije smanjuje. Daljnjim povećanjem energije navedene razine prelaze u kontinuum pri čemu dolazi do disocijacije molekule. Energija disocijacije (D_0) je razlika između energije kontinuum i energije nulte vibracijske razine. Ravnotežna energija disocijacije (D_{eq}) računa se pri ravnotežnoj udaljenosti atoma (r_{eq}), a uključuje i energije nulte vibracijske razine. Izborna pravila za vibracijske spektre dopuštaju promjenu vibracijskog kvantnog broja za ± 1 za harmonični, odnosno $\pm 2, \pm 3$ za anharmonični oscilator.¹

U vibracijskim spektrima se mogu pojaviti vrpce

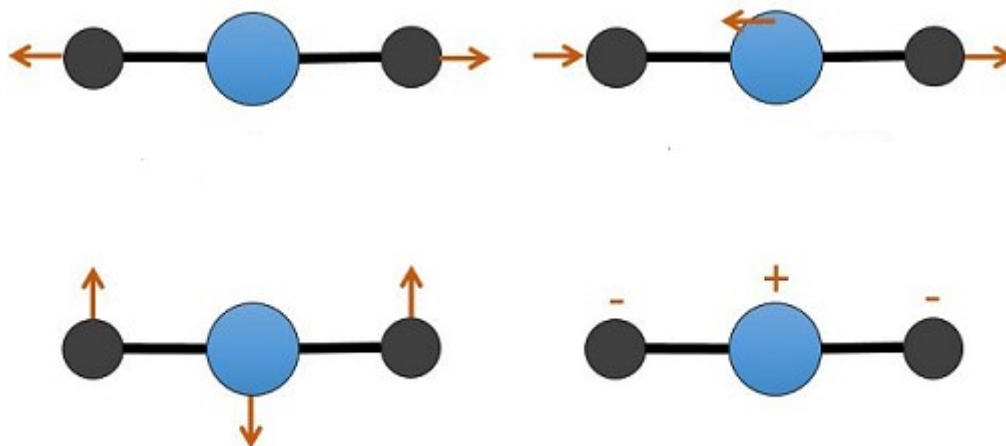
- a) gornjih ili viših tonova
- b) kombinacijske vrpce

Prijelaz iz nultog u prvo stanje naziva se osnovni prijelaz, dok se prijelazi iz nultog u drugo ili treće stanje nazivaju prvi odnosno drugi viši harmonik. Prema Boltzmanovom zakonu raspodjela napučenosti prve vibracijske razine je 1 % od napučenosti osnovne vibracijske razine. Dvoatomne molekule mogu izvoditi jedno vibracijsko gibanje. Ovisno o broju atoma u molekuli, višeatomne molekule mogu imati više osnovnih vibracija. Svaki pojedini atom u višeatomnoj molekuli može se gibati u tri prostorna smjera, pa je za njihovo opisivanje potrebno $3N$ prostornih koordinata. Broj vibracijskih stupnjeva slobode za nelinearne molekule je $3N-6$, za linearne molekule je $3N-5$, pri čemu je N broj atoma u molekuli. Broj stupnjeva slobode rotacije i translacije je za nelinearne molekule jednak 6. Linearne molekule imaju samo dva rotacijska stupnja, jer rotacija oko molekulske osi nije vezana ni za kakvo gibanje atoma ili centra mase. Primjeri vibracija za nelinearnu i linearnu molekulu prikazani su na slikama 1 i 2. Vibracije višeatomnih molekula mogu se sprežati pod određenim uvjetima:^{1,2}

- vibracije koje se sprežu moraju biti iste simetrije,
- najjača je interakcija između vibracija bliskih frekvencija,
- sprega između vibracija istezanja prisutna je ako vibracije uključuju zajednički atom,
- sprega između vibracija svijanja prisutna je ako vibracije uključuju zajedničku vezu,
- sprega između vibracija svijanja i istezanja postoji ako je veza koja se rasteže sastavni dio kuta koji se svija

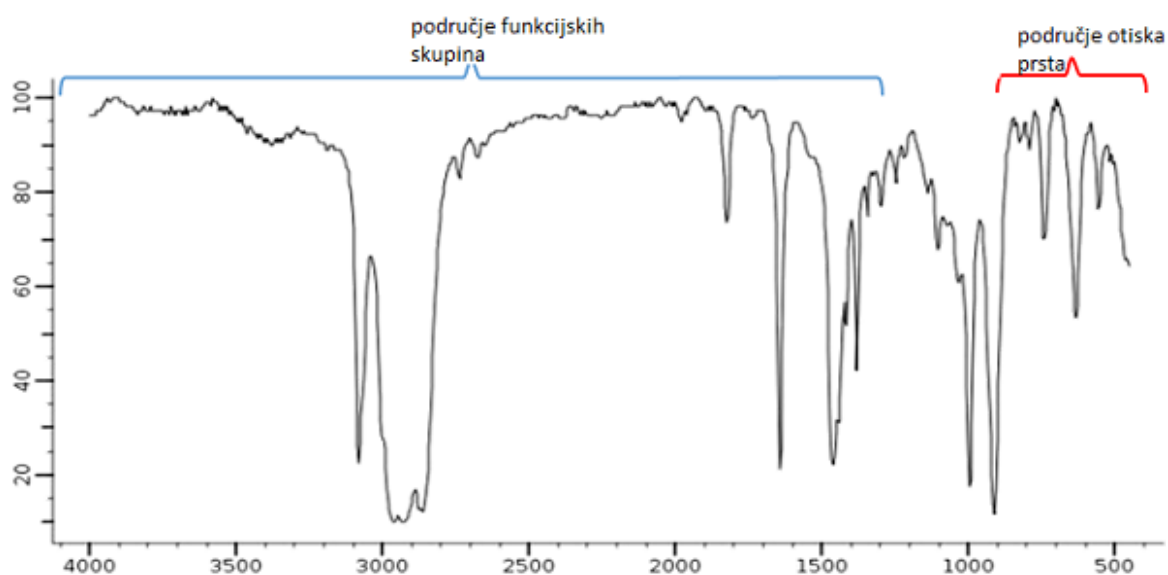


Slika 1. Osnovne vibracije molekule vode (nelinearna molekula).



Slika 2. Osnovne vibracije molekule ugljikovog dioksida (linearna molekula)

Infracrvena spektroskopija, IR, proučava interakciju tvari i elektromagnetskog zračenja u rasponu valnih duljina $12500\text{--}10\text{ cm}^{-1}$. Spektar IR pokazuje ovisnost apsorbancije ili transmitancije o valnom broju ili valnoj duljini. Područje spektra IR može se podijeliti na blisko ($12500\text{--}4000\text{ cm}^{-1}$), srednje ($4000\text{--}400\text{ cm}^{-1}$) i daleko ($400\text{--}10\text{ cm}^{-1}$). Za organske spojeve najzanimljivije je srednje područje valnih duljina. Njega možemo podijeliti na područje funkcijskih skupina ($4000\text{--}1400\text{ cm}^{-1}$) i područje otiska prsta ($1400\text{--}400\text{ cm}^{-1}$)¹



Slika 3. IR spektar koji pokazuje područje funkcijskih skupina i područje otiska prsta

Do vibracija dolazi uslijed apsorpcije elektromagnetskog zračenja. U infracrvenom spektru biti će opažene samo one vibracije kod kojih dolazi do promjene električnog dipolnog momenta. Ovisno o energiji apsorbiranog zračenja, u molekuli će se pobuditi točno određene vibracije pojedinih funkcijskih skupina, koje se mogu promatrati odvojeno.¹

Uređaj koji omogućava snimanje infracrvenih spektara nazivamo infracrveni spektrometar. Infracrveni spektrometar dolazi u dvije izvedbe:

- a) disperzivni spektrometar IR,
- b) spektrometar FT-IR .

Danas se najviše koristi spektrometar FT-IR zbog svoje osjetljivosti, brzine snimanja i točnosti. Glavni dijelovi spektrometra FT-IR su izvor zračenja, Michelsonov interferometar, pukotina, prostor za uzorak, detektor spojen na kompjuter. Kao izvor zračenja koriste se Globalov štapić i Nernstov štapić, a primjenjuju se i laseri. Infracrveno zračenje iz izvora prolazi kroz pukotinu i ulazi u Michelsonov interferometar. Michelsonov interferometar upadno zračenje na dijelitelju zrake dijeli na dva snopa koja putuju prema pokretnom, odnosno nepokretnom zrcalu gdje dolazi do refleksije, pa interferencije. Do konstruktivne ili destruktivne interferencije dolazi ovisno o razlici u optičkom putu. Nakon izlaska iz Michelsonovog interferometra zračenje prolazi kroz uzorak i djelomično se apsorbira. Propušteno zračenje dolazi do detektora koji to zračenje bilježi kao signal. Signal se računskim postupkom Fourierove transformacije pretvara u frekvencijsku domenu.¹

Infracrvenu spektroskopiju možemo koristiti za analizu uzoraka u svim agregacijskim stanjima. Za pripremu čvrstih uzoraka koristimo tehniku KBr pastile ili pripremu suspenzije u mineralnom ulju. KBr pastile pripremaju se usitnjavanjem uzorka i kalijevog bromida u tarioniku i to u omjeru 1:100 ili prešanjem u hidrauličkoj preši. Suspenzija uzorka u mineralnom ulju priprema se miješanjem uzorka s nekoliko kapi ulja i to se postavlja između dvije pločice od KBr ili NaCl. Tekući uzorci snimaju se u kivetama za tekućine. Sa svake strane kivete nalaze se prozori izrađeni od alkalijskih i zemnoalkalijskih halogenida postavljenih na metalni nosač. Plinoviti uzorci snimaju se u plinskim kivetama. Optički put u kivetama je dulji. Optički put se može produžiti sustavom zrcala.¹

Skupinska vibracija je vibracija čija se vrpca nalazi u spektru molekule koja sadrži određenu skupinu i nalazi se u uskom području spektra. Dijelovi molekule čije su konstante sila i mase sličnog iznosa stupaju u jaku interakciju. Pri slabom uzajamnom utjecaju

apsorpcijski maksimumi ostaju u uskim i karakterističnim područjima. Skupinska vibracija i njezina frekvencija određuju se empirijski. Na položaj vibracijske vrpce mogu utjecati vodikove veze, induktivni i rezonantni efekt i konjugacija.

Valni broj vrpce skupinske vibracije ν prema Hookeovom zakonu proporcionalan je konstanti sile k , a obrnutno proporcionalna reduciranoj masi μ :

$$\tilde{\nu} = \frac{1}{2\pi c} \sqrt{\frac{k}{\mu}} \quad (2)$$

Vodikova veza, konjugacija i rezonancija utječu na jakost veze i konstantu sile. Vibracije funkcijskih skupina koje sudjeluju u vodikovoj vezi nalaziti će se pri nižim valnim brojevima. Ako se u blizini skupine nalazi elektronegativni heteroatom, položaj vibracijske vrpce ovisi o induktivnom efektu. Induktivni efekt povećava konstantu sile i valni broj vibracije funkcijske skupine. Intezitet vibracijske vrpce ovisi o promjeni električnog dipolnog momenta, vrpca je intenzivnija ako je promjena veća.

Molekule sa centrom simetrije posjeduju različite vrpce u infracrvenim spektrima. Vibracijama kojima se mijenja polarizibilnost molekule ne dolazi do promjene električnog dipolnog momenta. Iz tih razloga vrpce koje se pojavljuju u Ramanovim spektrima nisu prisutne u infracrvenim spektrima. Vibracijama kod kojih dolazi do promjene električnog dipolnog momenta ne mijenja se njezina polarizibilnost, te vibracijske vrpce nisu prisutne u Ramanovim spektrima. Pravilo isključenja vrijedi samo kada molekula ima centar simetrije.¹

2.1.3 Kromatografija

Kromatografija je fizikalna metoda separacije u kojoj se sastojci raspodjeljuju između dvije faze. Jedna faza je nepokretna, a druga se kreće u određenom smjeru. Razdvajanje kemijskih vrsta kromatografskom tehnikom temelji se na razlikama u njihovoj raspodjeli između dvije faze koje se međusobno ne miješaju. Uzorak za analizu mora biti topljiv u pokretnoj fazi. Nepokretna faza može biti tekućina, gel ili krutina. Uzorak nošen pokretnom fazom kreće se kroz ili uzduž nepokretne faze koja je smještena na koloni ili na podlozi. Sastojci uzorka se neprestano raspodjeljuju između faza. Što se više puta ravnotežna raspodjela uspostavi to je bolje i djelotvornije razdvajanje uzoraka.³

Kromatografske tehnike možemo podijeliti prema obliku kromatografske podloge na kolonsku i plošnu (papirna i tankoslojna) kromatografiju.

Prema fizičkom stanju kromatografske tehnike dijele se na:

- plinsku kromatografiju, GC, u kojoj je pokretna faza plin,
- tekućinsku kromatografiju, LC, u kojoj je pokretna faza tekućina, tekućinska kromatografija u kojoj se upotrebljavaju nepokretne faze vrlo malih čestica uz visoki tlak pokretne faze na ulazu u kolonu naziva se tekućinskom kromatografijom visoke djelotvornosti, HPLC.
- fluidnu kromatografiju pri superkritičnim uvjetima, u kojoj je pokretna faza fluid, temperature ili tlaka blizu ili iznad njegove kritične vrijednosti

Prema mehanizmu odvajanja kromatografske tehnike dijele se na :

- adsorpcijsku kromatografiju,
- razdjelnu kromatografiju,
- ionsko-izmjenjivačku kromatografiju,
- kromatografiju isključenjem,
- afinitetnu kromatografiju.

Tekućinska kromatografija koristi se za odjeljivanje spojeva malih i velikih molekulskih masa, termički nestabilnih spojeva, spojeva koji se mogu prevesti u plinovito stanje, te biološki aktivnih spojeva. Pokretna faza u tekućinskoj kromatografiji je tekućina (voda ili organska otapala) u kojoj se analizirani uzorak mora otapati. Tekućinska kromatografija može se provoditi u koloni ili na tankom sloju nepokretne faze.

Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti, HPLC, je najviše korištena od svih tehnika separacije. Principi kromatografskog razdvajanja su: adsorpcija, ionska izmjena, isključivanje, afinitetna kromatografija.

Tekućinsko-čvrsta kromatografija temelji se na principu adsorpcije.

Tekućinsko-tekućinska kromatografija temelji se na principu razdjeljivanja, a dijeli se na:

- kromatografiju normalnih faza,
- kromatografiju obrnutih faza.

Ionsko-izmjenjivačka kromatografija u kojoj se razdvajanje temelji na razlici u afinitetu sastojaka prema ionskoj izmjeni.

Kromatografija isključenjem u kojoj se odvajanje temelji na razlikama u veličinu i obliku molekula. Molekule određene veličine ne mogu ući u pore nepokretne faze i tako se odvajaju od manjih molekula. ³

Afinitetna kromatografija u kojoj se razdvajanje temelji na interakcijama analita i molekula vezanih za nepokretnu fazu. Izokratno eluiranje je najjednostavniji način odjeljivanja tekućinskom kromatografijom. Kada se sastav pokretne faze mijenja tijekom ispiranja dobije se bolji kromatogram. Za potiskivanje pokretne faze u kromatografsku kolonu koristi se crpka. Postoje dvije vrste crpki: ubrizgavajuća crpka i naizmjenična crpka. Otapala koja se koriste u tekućinskoj kromatografiji visoke djelotvornosti ne smiju sadržavati otopljene plinove i čvrste čestice i moraju biti visoke čistoće. Za unošenje uzorka koristi se prenosni injektor s petljom. Petlje se mogu mijenjati i različitih su volumena. Uzorak se u petlju unosi injekcijskom špricom. Usmjeravanjem eluenta kroz napunjenu petlju uzorak se injektira u kolonu. Kolone koje se koriste u tekućinskoj kromatografiji visoke djelotvornosti moraju imati određene karakteristike:

-duljina 250 mm i unutarnji promjer 4.6 mm

-čestice nepokretne faze promjera 5 ili 10 μm

Danas se upotrebljavaju kolone manjih dimenzija duljine 30 mm do 75 mm,

unutarnji promjer < 1 mm, promjer čestica nepokretne faze 3 μm

Ispred glavne kolone stavlja se predkolona zbog zaštite kolone i boljeg razdvajanja sastojaka.

U tekućinskoj kromatografiji moguća je detekcija sastojaka na temelju njihovih svojstava i indirektna detekcija. Detekcija sastojaka apsorpcijskim detektorima mjeri se na temelju apsorpcije UV i vidljivog svjetla u pokretnoj fazi. Postoje različite vrste UV-detektora.³

- fotometar s ugrađenom optičkom rešetkom,
- detektor s nizom fotodioda,
- fotometar sa živinom lampom.

Za detekciju sastojaka koji fluoresciraju koriste se fluorimetrijski detektori koji su 1000 puta osjetljiviji od UV-detektora. Kao izvor zračenja koristi se živina lampa ili ksenonov luk, dok se valne duljine pobude i emisije biraju pomoću monokromatora. Fluorometrijskim detektorima mogu se detektirati i sastojci koji ne fluoresciraju, ako se prevedu u fluorescirajuće derivate.³

2.2. Psorijaza

Psorijaza je kronična recidivirajuća autoimuna bolest s multigenetskom predispozicijom. Psorijaza može biti udružena s drugim bolestima od autoimunih do alergijskih, iz tih razloga nazivamo je i multisustavnom bolešću. Uzrokuju je abnormalnost keratinocita (epidermalnih stanica) i imunosne disfunkcije.⁴ Klinički se manifestira pojavom upalnih, oštro ograničenih ploča različite veličine prekrivenih srebreno-bijelim ljuskama⁴. Etiopatogeneza još uvijek nije dovoljno istražena, ali se pretpostavlja da psorijaza nastaje međusobnim ispreplitanjem genetskih i okolišnih čimbenika. Za ispoljavanje bolesti kod osoba koje imaju genetske predispozicije neophodno je djelovanje virusnih i bakterijskih čimbenika. Kao okidač bolesti mogu biti i male traume lokalizirane na koži npr. opekline od sunca, tetovaže i ogrebotine, te klimatski uvjeti i izloženost prirodnom suncu. Psorijaza tipa I. nastaje prije 40. godine života i karakterizira je vrlo jaka genetska predispozicija, dok psorijaza tipa II. nastaje u razdoblju između 50 i 60 godine života. Čak i kada psorijaza nastaje u blažem obliku uvelike utječe na život pacijenta narušavajući njegovu kvalitetu. Psorijazu dijelimo u pet glavnih oblika:

- inverzna psorijaza,
- gutatna psorijaza,
- plak psorijaza,
- gnojna psorijaza,
- ertirodemična psorijaza.

S time da se mora naglasiti da se prema kliničkoj slici dijeli samo na plak psorijazu i pustuloznu psorijazu. Pustuloznu (gnojnu) psorijazu karakteriziraju pustule ispunjene neinfektivnim gnojem. Zahvaća male površine kože kao što su dlanovi, nokti i tabani.¹¹

Plak psorijaza je najčešći tip psorijaze, koji zahvaća većinu pacijenata oboljelih od psorijaze. Plak psorijazu karakteriziraju crveni plakovi, upaljenih oštih rubova i različitih veličina koji su prekriveni srebreno-bijelim ljuskicama. Plak psorijaza obuhvaća koljena, laktove, podlaktice, nadlaktice, tjeme, lice, dlanove i nokte.¹¹

Inverznu psorijazu karakteriziraju duboki bijeli ili crveni plakovi oštih rubova koji su glatki i sjajni. Inverzna psorijaza zahvaća laktove, pazuhe i nabore kože.

Gutatna ili kapljična psorijaza jedan je od rijedih oblika psorijaze koji najčešće zahvaća adolescente i djecu. Karakteriziraju je crvene papule na koži, a nastaje nakon infekcije dišnih puteva streptokokom.⁴

Eritrodemična psorijaza je najopasniji oblik psorijaze koji može dovesti do smrti pacijenta. Karakteriziraju je jako crvenilo, te jaki bolovi.

Pacijenti oboljeli od psorijaze imaju povećan rizik oboljevanja od kardiovaskularnih bolesti, limfoma, karcinoma kože, dijabetes, atritis, ucelarnog kolitisa i Chronove bolesti.

Vrlo je bitno razlikovati psorijazu od seboreičnog dermatitisa, kožnog limfoma i različitih oblika dermatitisa. Kod dijagnostike psorijaze vrlo je bitno dobro odrediti stupanj bolesti, jer se prema njemu određuje terapija. Težina bolesti se opisuje prema tri skale.

BSA (eng. *Body Surface Area*), je aritmetička mjera koja vrednuje postotak zahvaćenosti površine tijela. PASI (eng. *Psoriasis Severity Area Index*) uzima u obzir stupanj eritema, infiltracije i stupanj ljuštenja psorijatičnih lezija na glavi, trupu, gornjim i donjim ekstremitetima. Ove su značajke procijenjene koristeći skalu :

- 0 znači izostanak simptoma,
- 1 mali broj simptoma,
- 2 umjerene simptome,
- 3 srednje teške simptome,
- 4 teške simptome.

Prekrivenost kože se vrednuje prema sljedećoj skali: 0 : 0% prekrivena površina, 1: <10% prekrivenosti površine, 2: 10–29% prekrivenosti površine, 3: 30–49% prekrivenosti površine, 4: 50–69% prekrivenosti površine, 5: 70–89% prekrivenosti površine, 6: 90–100% prekrivenosti površine.

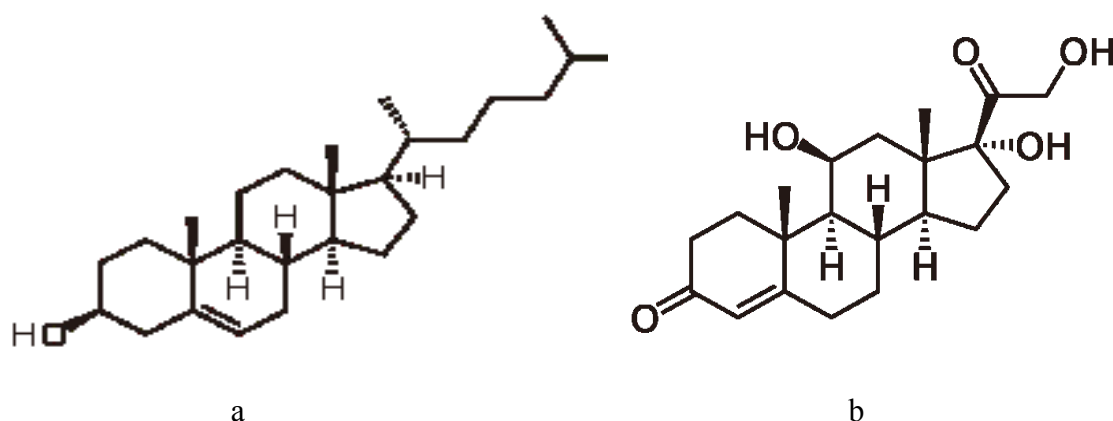
DQLI (eng. *Dermatological quality of life index*) je upitnik od 10 pitanja na koje odgovara pacijent. Dobna granica pacijenta je 16 godina. Na temelju tih pitanja i odgovora se utvrđuje težina bolesti. Svako pitanje se boduje sa 0–3 boda: 0–1 bod (bolest ne utječe na pacijentov život), 2–5 (ima mali utjecaj), 6–10 (umjereni utjecaj), 11–20 (veliki utjecaj), 21–30 (ekstremno veliki utjecaj). Ovisno o obliku bolesti određuje se terapija za pacijenta. Kako je većina pacijenata blago ili srednje oboljela najčešće se koristi topička terapija. Topička terapija ima za cilj njegu kože i hidrataciju pomoću emolijensa, keratolitičko djelovanje i nanošenje kortikosteroida. Emolijensi kao što je vazelin njeguje kožu i umiruje, a pomoću salicilne kiseline se uklanjaju ljuskice.⁴

2.3. Kortikosteroidi i nesteroidni protuupalni lijekovi

Kortikosteroidi su steroidni hormoni koje proizvodi kora nadbubrežne žlijezde. Danas su razvijeni sintetski derivati prirodnih kortikosteroida kojima su neke farmakološke osobine pojačane, a druge potisnute. Sintetiziraju se iz kolesterola, pa su im kemijske formule jako slične. Dvije se vrste luče u organizmu –mineralokortikoidi i glukokortikoidi.

Glukokortikoidi sa kortizolom kao glavnim predstavnikom sudjeluju u regulaciji metabolizma ugljikohidrata, masti i proteina, imaju protuupalno djelovanje, te dugoročno pripremaju organizam na stres. Mineralokortikoidi s aldosteronom kao glavnim predstavnikom sudjeluju u regulaciji razine vode i elektrolita. Glukokortikoidi smanjuju imunološki odgovor organizma, što znači da imaju jako antiinflamantarno, imunosupresivno djelovanje zbog koje su postali jedna od najznačajnijih skupina lijekova. Sintetski analozi kortizola su: betametazon, deksametazon, prednizolon i prednizon.

Postoji još podjela prema: načinu primjene, kemijskoj strukturi, jačini djelovanja i vremenu djelovanja. Prema jačini djelovanja dijele se u četiri razreda.



Slika. 4 Kolesterol (a) i kortizol (b)

Na odabir kortikosteroida za liječenje psorijaze uzima se u obzir dob pacijenta, postotak zahvaćene kože i druga terapija koju pacijent pije. U terapiji psorijaze kortikosteroidi se koriste kao monoterapija ili u kombinaciji sa sistemskom terapijom.

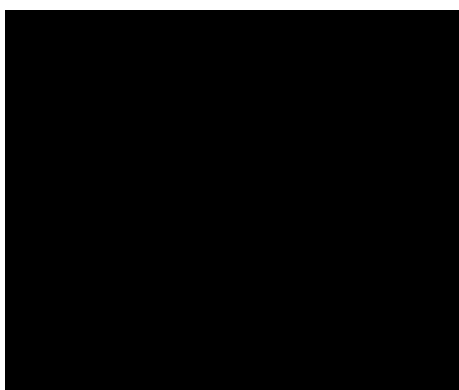
Kortikosteroidi izazivaju snažne terapijske učinke, za određivanje terapijskog učinka koristi se test vazokonstrikcije.

Prema europskom sustavu kortikosteroidi se klasificiraju u četiri skupine: vrlo jaki kortikosteroidi, jaki kortikosteroidi, umjereni kortikosteroidi, blagi kortikosteroidi. Mehanizam djelovanja kortikosteroida uključuje imunosupresivne, vazokonstruktivne i protuupalne efekte. Učinkovitost djelovanja kortikosteroida raste s njihovom jakošću. Koriste se pod liječničkim nadzorom, i to u vremenskom razdoblju od 2 tjedna. Veliki problem predstavlja tolerancija na terapiju ili smanjena učinkovitost.

Nesteroidni protuupalni lijekovi (NSAR) se mogu podijeliti u nekoliko kemijskih skupina: derivati propionske kiseline, derivati feniloctene kiseline, derivati indola i oksikami. Svi predstavnici ove skupine su slabe organske kiseline. Svi pripadnici NSAR-a imaju iste nuspojave u organizmu. To su lijekovi koji imaju analgetičke, antipiretičke, i u većim količinama protuupalne karakteristike. Oni istovremeno ublažavaju upale i bolove. Najpoznatiji su predstavnici ove skupin aspirin i ibuprofen.⁵

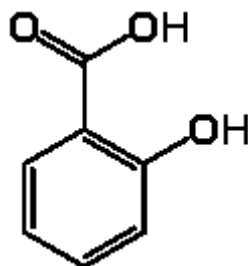
Salicilati su se koristili još u vrijeme Sumarena.⁶ U Europi je kao izvor salicilata koristila kora bijele vrbe. Vrba pripada porodici *Salicaceae* i farmakološki ima protuupalno, antipiretsko, antireumatsko i analgetičko djelovanje. Njezin aktivni sastojak zove se salicin. 1828. godine izoliran je salicin koji ima glikozidni karakter, te je preveden u salicilnu kiselinu. Acetilizacijom salicilna kiselina je prevedena u acetilsalicilnu kiselinu.⁷

Acetilsalicilna kiselina, ASK, organska je kiselina koja se u organizmu hidrolizira na octenu kiselinu i salicilat. Koristi se kao salicilatni lijek koji djeluje protuupalno, te kao analgetik i antipiretik. U visokim dozama koristi se kod reumatoidnog artritisa. Danas se primjenjuje i u terapiji raka pluća i prostate.



Slika 5 Acetilsalicilna kiselina

Salicilna kiselina, 2-hidroksibenzojeva kiselina, osnovna je supstanca salicilata. Pripada skupini nesteroidnih protuupalnih lijekova. Salicilna kiselina ima antireumatsko i analgetsko djelovanje.



Slika 6. Salicilna kiselina

2.4. Polučvrsti pripravci za lokalnu primjenu

Polučvrsti pripravci za kožu rabe se za radi postizanja lokalnog ili transdermalnog nanošenja djelatnih tvari ili zbog njihovog zaštitnog učinka. Homogenog su izgleda. Polučvrsti pripravci za primjenu na koži sastoje se od jednostavne ili složene podloge, u kojoj je obično otopljena ili raspšena jedna ili više djelatni tvari. Ovisno o pripravku podloga može utjecati na djelotvornost pripravka. Podloga može prirodne ili sintetske tvari i ima jednu ili više faza. Ovisno o podlozi pripravci mogu imati hidrofilne ili hidrofobne osobine. Mogu sadržavati prikladne pomoćne tvari kao što su konzervansi, antioksidansi, tvari koje povećavaju stabilnost, emulgatore, tvari koje povećavaju viskoznost. Razlikujemo nekoliko skupina tih tvari: kreme, masti, gelovi, paste, kataplazme, ljekoviti flasteri.

Masti se sastoje od jednofazne podloge u kojoj mogu biti raspršene čvrste tvari ili tekućine. Hidrofobne masti mogu apsorbirati samo malo vode. Tipične su podloge u oblikovanju: tvrdi parfin, tekući parafin, vrlo tekući parafin, biljna ulja, životinjska mast, sintetički parafin. S vodom emulgirajuće masti mogu apsorbirati veću količinu vode te tako tvore emulzije tipa voda u ulju ili ulje u vodi ovisno o prirodi emulgatora. Emulgatori koji tvore emulzije tipa voda u ulju su lanolin, sorbitanski esteri, monogliceridi i masni alkoholi, a emulgatori koji tvore emulzije tipa ulje u vodi su sulfatizirani masni alkoholi, polisorbati, esteri makrogola i viših masnih kiselina. Imaju podlogu kao i hidrofobne masti. Hidrofilne masti su pripravci koji su sastavljeni od podloga koje se miješaju sa vodom. Podlogu čine smjese tekućih i čvrstih makrogola (polimeri polietilenglikola). Mogu sadržavati određenu količinu vode.

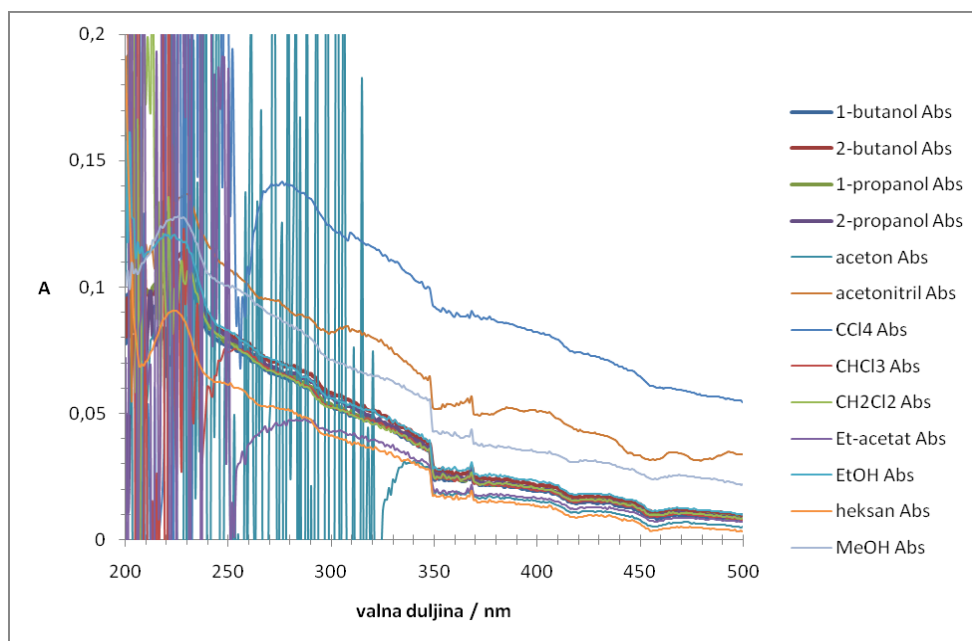
Kreme su višefazni pripravci koji se sastoje od lipofilne i vodene faze. Lipofilne kreme imaju kao vanjsku fazu lipofilnu fazu. Sadrže emulgatore koji tvore emulzije tipa voda u ulju, kao što su lanolin, esteri sorbitana i monoglicerida. Hidrofilne kreme imaju, kao vanjsku fazu hidrofilnu fazu. Sadrže emulgatore koji tvore emulziju tipa ulja u vodi, kao što su natrijevi sapuni, polisorbati i kombinacije masnih kiselina i estera masnih kiselina.

§ 3. EKSPERIMENTALNI DIO

Analizirana su dva uzorka kreme i masti nepoznatog sastava koji su bili indicirani na psorijazu. Kako bi definirali točan sastav krema i masti, te za usporedbu spektara bilo je potrebno analizirati i komercijalno dostupne kreme i masti koji su indicirani na psorijazu, te isto tako nosive matrice za takve pripravke. Paralelno analizirane matrice su bile belobaza i vazelin. Analizirane su sljedeće kreme i masti: Afloderm, Elocom, Beloderm, Belogent, Ornazol i Aloe Vera. Sve ove kreme i masti su kao aktivni sastojak sadržavale kortikosteroide kao aktivnu komponentu. Za analizu uzoraka korištene su: tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (HPLC), vibracijska spektroskopija i spektrometrija UV.

3.1. Spektrometrija u području UV

Uzorci i matrice su otopljeni u različitim organskim otapalima. Na analitičkoj vagi *Mettler Toledo* izvagano je 25 mg uzorka nepoznatog sastava kao i 25 mg belobaze i vazelina. Nakon toga su uzorci uz ultrazvučnu agitaciju otopljeni u organskim otapalima $V=25$ ml. Otapala koja su se koristila bila su: metanol, etanol, propan-1-ol, propan-2-ol, butan-1-ol, *sec-butanol*, diklormetan, kloroform, tetraklormetan, aceton, etilacetat, heksan. Primjenjena je i smjesa otapala kloroform/etanol, metanol/voda, acetonitril/voda i to u različitim volumnim omjerima 40:60 %, 50:50 %, 60:40 %. Najbolja topljivost uočena je u propan-1-ol-u uzorka 1 i 2, te belobaze i vazelina. Mjerenja su napravljena na uređajima Analytikjena Specord200 i Cary3 (varium).



Slika 7. Spektri UV uzorka 1 u različitim otapalima.

Kod otapala koja smo upotrebljavali u svrhu određivanja topljivosti postoji donja granica propusnosti ultraljubičastog zračenja, za propan-1-ol je to na nižim valnim duljinama od 210-220 nm. Iz tog razloga nisu sva otapala prikladna za analizu spektroskopijom UV. Donja granica propusnosti utječe na izgled spektra UV. Spektri otapala mogu utjecati na spektralna svojstva sustava.

3.2. Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti obrnutih faza, RP-HPLC

Kao mobilna faza korištena je otopina vode i acetonitrila s dodatkom octene kiseline. Volumen injektiranja je bio 20 μ l, valna duljina 254 nm, uzorak je injektiran dva puta. Vagano je 0,5 g kreme ili masti koja je otapana u 10 ml mobilne faze uz pomoć povišene temperature i ultrazvuka.

3.3. Metoda LC-MS

Mjerenje uzoraka 1 i 2 napravljena su na uređaju HPLC Agilent 1200 Series s DAD detektorom i spektrometrom mase s trostrukim kvadrupolom uz ionizaciju elektroraspršenjem u negativnom i pozitivnom modu. Parametri MS-a su bili sljedeći: kapilarni napon 3,0 kV, konusni napon 20 V, temperatura otapanja 250 °C, temperatura izvora 100 °C, protok dušika 420 L/sat.

3.4. Infracrvena spektroskopija

Mjerenja uzoraka 1 i 2 napravljena su na uređaju Bruker Vector 22. Uzorci su snimani u obliku KBr pastile. Svaki spektar je dobiven kao rezultat 32 skena u rasponu 4000-400 cm^{-1} i rezoluciji od 1 cm^{-1} .

§ 4. REZULTATI I RASPRAVA

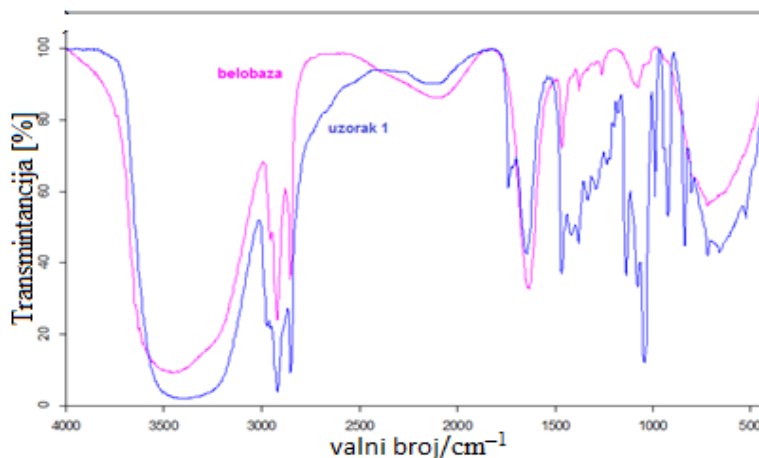
Za određivanje sastava zaprimljenih uzoraka nepoznatog sastava, kao i uzoraka komercijalno dostupnih krema i masti, prikazanih u Tablici 4.1, primijenjena je vibracijske spektroskopija IR. Uzorci su snimani u obliku KBr pastile.

Tablica 4.1 Aktivna tvar analiziranih krema i masti

Krema ili mast	Aktivna tvar
Afloderm	Alklometazon dipropionata
Belosalic	betametazon, salicilna kiselina
Elocom	mometazon furoat
Oronazol	Ketokonazol (antimikotik)

4.1. Infracrvena spektroskopija

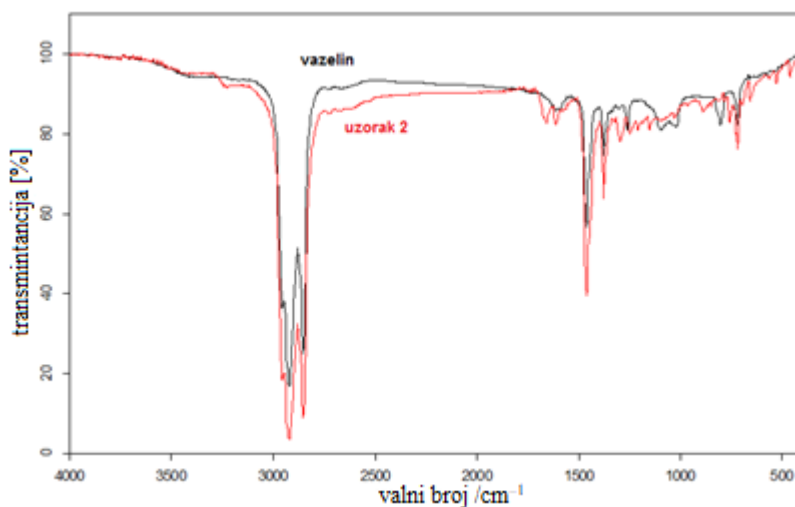
Podrobnijim promatranjem infracrvenih spektara matrica i uzoraka opažene su sličnosti i razlike u položaju signala. Usporedbom infracrvenih spektara dva zaprimljena uzorka i nosivih baza došlo se do zaključka da je u uzorku 1 matrica belobaza, a u uzorku 2 vazelin. Belobaza je po svom sastavu složeni uzorak koji sadži alifatske, cikličke te aromatske ugljikovodike, alkohole, fosfornu kiselinu i natrijev hidroksid. Vazelin je također smjesa spojeva, ali uglavnom sadrži ravnolančane ugljikovodike.



Slika 8. Infracrveni spektri belobaze i uzorka 1

U infracrvenom spektru belobaze i uzorka 1 prikazanom na slici 8 uočene su neke karakteristične vrpce. Tri vrpce opažene pri $\sim 3000 \text{ cm}^{-1}$ karakteristične su za istezanje veze C–H u alifatskim skupinama. Vrpce u području $1740 - 1600 \text{ cm}^{-1}$ mogu se pripisati istezanju veze C=O. Vrpce opažene pri 1470 , 1380 i 720 cm^{-1} odgovaraju savijanju veza C–H. Vrpca opažena pri 1100 cm^{-1} može se pripisati vezi C–Cl. Vrpca opažena pri 1400 cm^{-1} pripada aromatskim spojevima, dok ona pri 720 cm^{-1} odgovara skupini CH_2 .

U spektru uzorka 1 kojem je matrica belobaza uočava se velika količina prisutne vode. Ona je sastojak same belobaze. Neke od prisutnih apsorpcijskih maksimuma u uzorku 1 nije moguće asignirati na temelju usporedbe sa spektrom belobaze, a pripadaju aktivnoj komponenti.

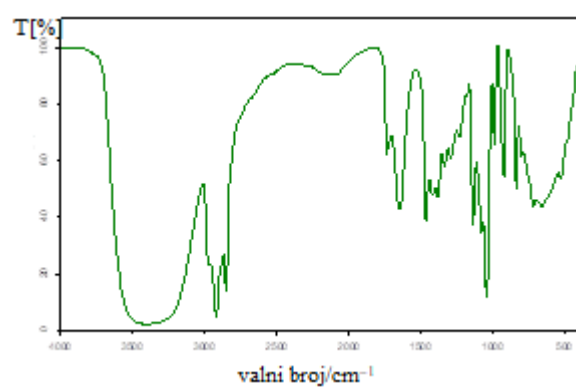


Slika 9. Infracrveni spektar vazelina i uzorka 2

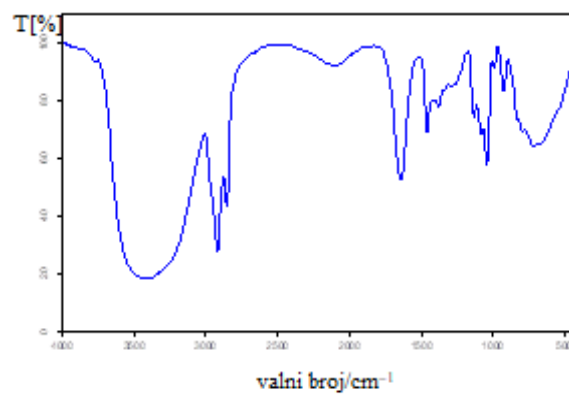
U infracrvenom spektru uzorka 2 i vazelina najuočljivije su vrpce koje se mogu pripisati zasićenim ugljikovodicima. Vrpca opažena pri $\sim 3000\text{ cm}^{-1}$ karakteristična je za alifatsko istezanje C–H. Vrpce u području $1610\text{--}1600\text{ cm}^{-1}$ mogu se pripisati višim harmonicima aromatskih spojeva. Vrpce opažene pri $1470, 1380, 720\text{ cm}^{-1}$ mogu se pripisati svijanju veze C–H. Vrpca pri 1300 cm^{-1} pripisuje se aromatskim spojevima.

U spektru uzorka 2 dominira alifatski ugljikovodik, što upućuje da je vazelin dominantan sastojak.

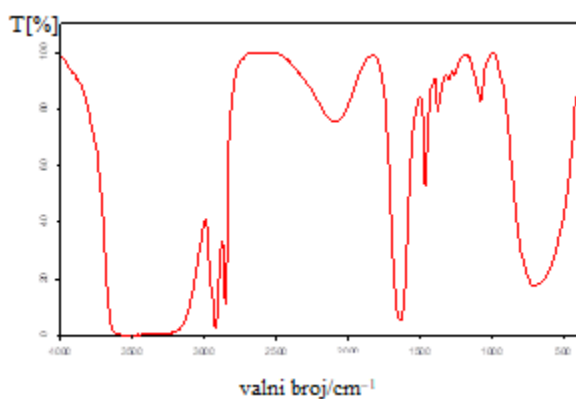
Da bi se mogla detektirati aktivna tvar u uzorku 1 snimljeni su i analizirani spektri komercijalno dostupnih krema i masti: Afloderm, Elocom, Beloderm, Belogent, Oronazol, a prikazani su na slici 10.



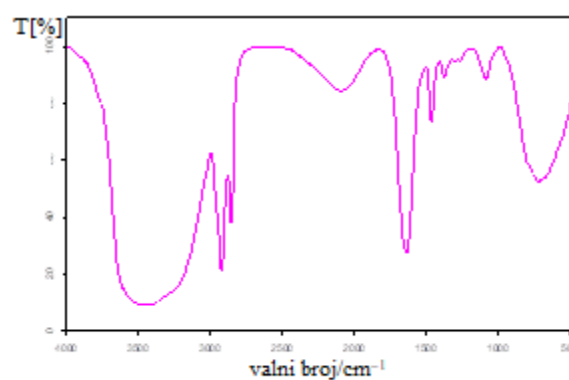
Uzorak1



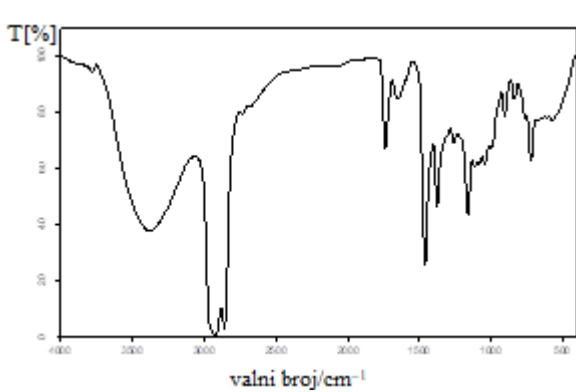
Afloderm



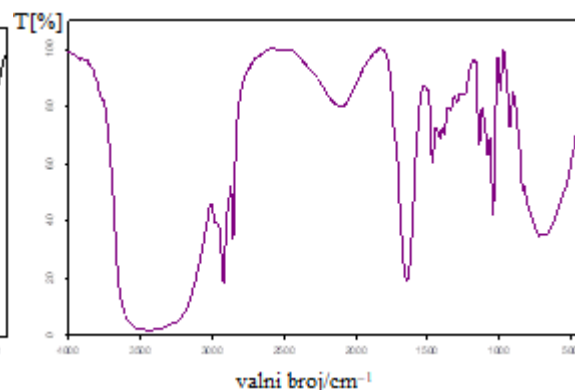
Beloderm



Belogent



Elocom



Oronazol

Slika 10. Infracrveni spektri komercijalnih krema i masti

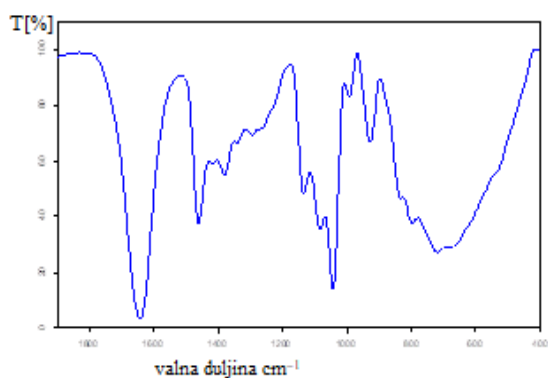
§ 4. Rezultati i rasprava

Iz slike 10 je vidljivo da spektri Belodema i Belogenta nemaju sličnosti sa spektrom uzorka 1, iako je osnovni nositelj belobaza čije se vrpce očituju u svim spektrima. Vrpca pri 3500 cm^{-1} odgovara istezanju veze O–H. Vrpca pri 3000 cm^{-1} možemo pripisati alifatskom istezanju

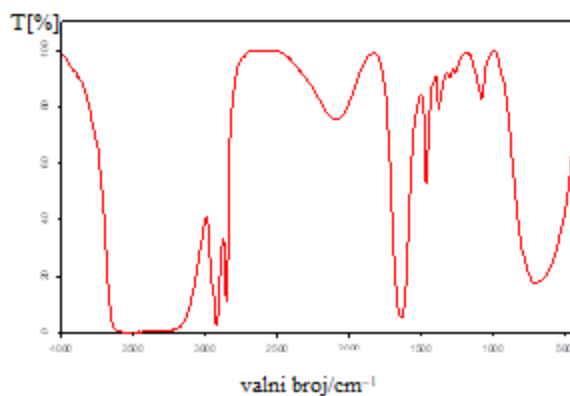
veze C–H. Vrpce pri 1740 i 1600 cm^{-1} odgovaraju skupini C=O, u svim spektrima se vidi znatna prisutnost hidroksilnih skupina i vrpce istezanja alifatskih skupina C–H.

Stoga je potrebno usporediti spektre u tzv. području otiska prsta od 1900 cm^{-1} i niže. Spektri su prikazani na slici 11.

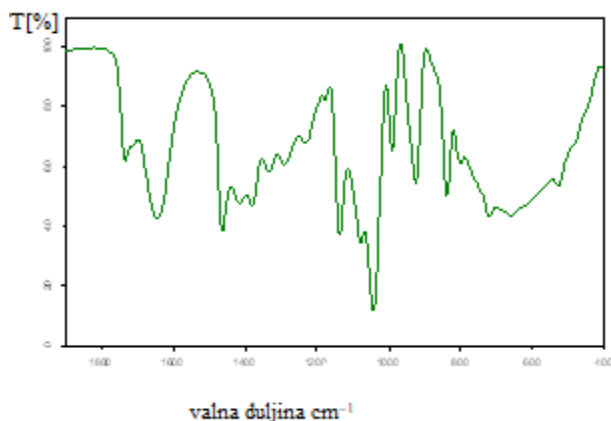
Afloderm



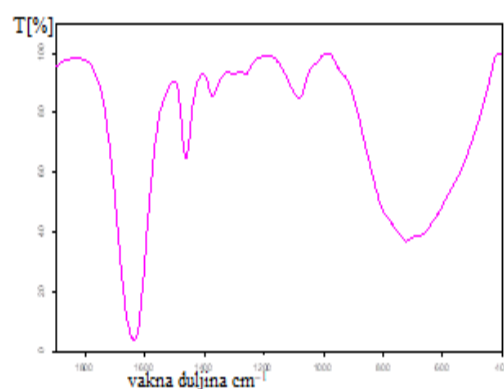
Beloderm

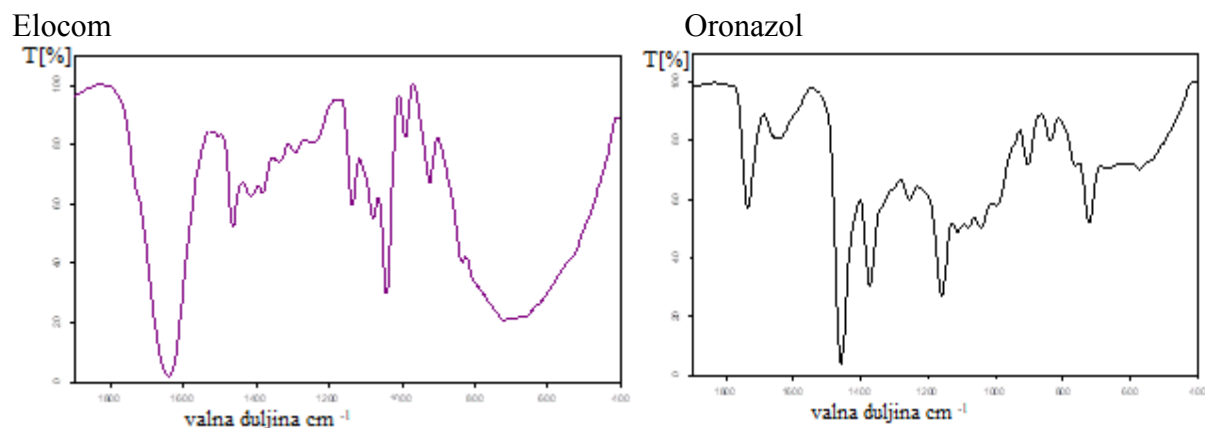


Uzorak 1



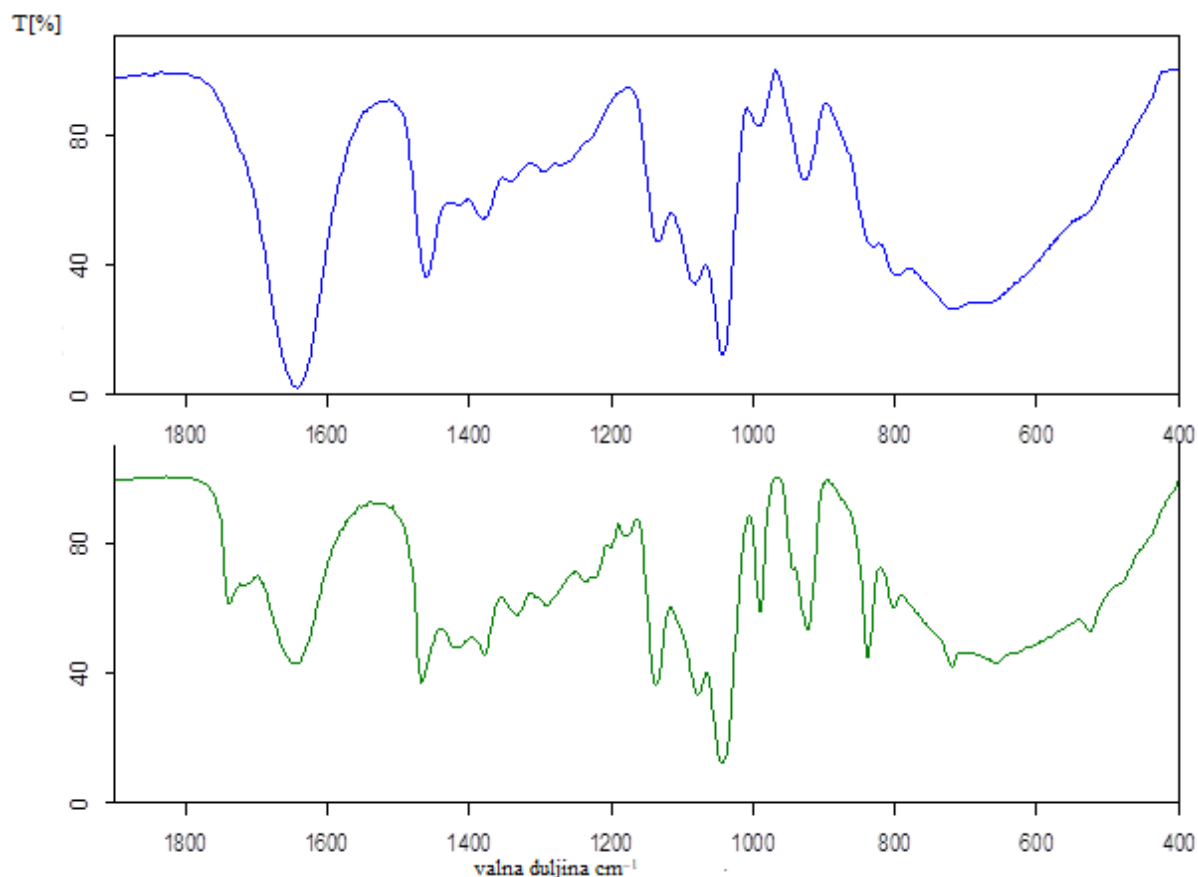
Belogent





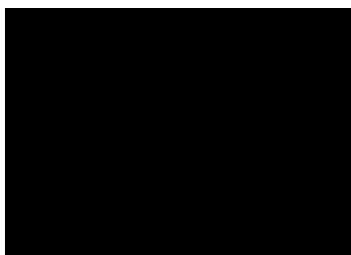
Slika 11. Infracrveni spektri uzorka i komercijalnih pripravaka u području od 1900 cm⁻¹ do 400 cm⁻¹

Promatranjem ovog dijela spektra izbor komercijalnih krema i masti možemo suziti na Afloderm, Elocm i Oronazol. U infracrvenom spektru Beloderma i Belogenta uočene su karakteristične vrpce pri 1610 cm⁻¹ koja se može pripisati istezanju veze C=O. Vrpca pri 1400 cm⁻¹ odgovara višim harmonicima aromatskih spojeva, dok se vrpca pri 720 cm⁻¹ može pripisati svijanju veze C–H.



Slika 12. Infracrveni spektari uzorka 1 (dolje) i Afloderma (gore)

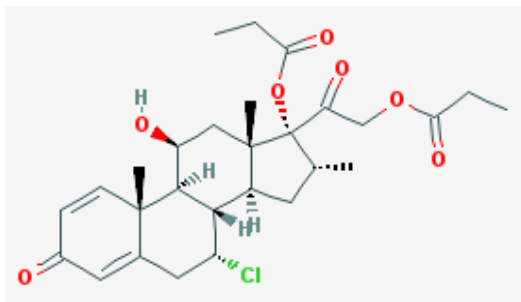
Afloderm kao aktivnu komponentu sadrži spoj alkometazon dipropionat. Alkometazon je sintetički glukokortikoidni steroid za topičku primjenu u dermatologiji. To je spoj čija je struktura prikazana na slici 13



Slika 13. Struktura Alkometazona

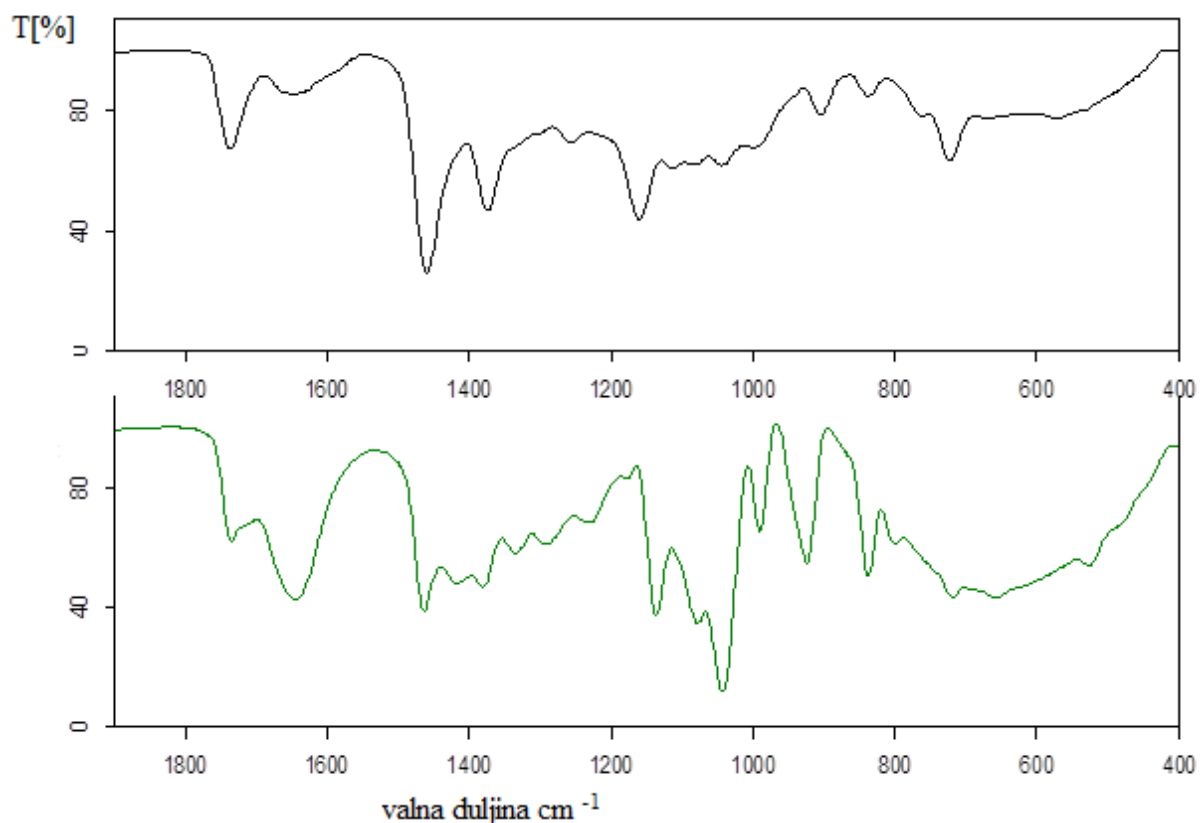
sustavnog imena [7-kloro-11-hidroksi-10,13,16-trimetil-3-okso-17-(2-propanoiloksiacetyl)-7,8,9,11,12,14,15,16-oktahidro-6*H*-ciklopenta[*a*]fenantren-17-il] propanoat.

Alkometazon dipropionat je spoj čija je struktura prikazana na slici 14., molarne mase 521,042 g mol⁻¹.



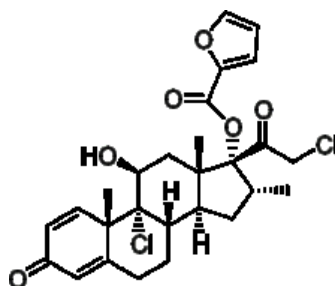
Slika 14. Struktura Alkometazon dipropionata

U literaturi postoje podaci o različitim tehnikama snimanja spektara koji sadrže alkometazon dipropionat. U novijoj literaturi autori Yamamoto i suradnici ⁸ zadržali su se na identifikaciji signala pri 1608, 1656 i 1720 cm⁻¹ koje su pripisali ketonskim i esterskim skupinama.



Slika 15. Infracrveni spektari Elocoma (dolje) i uzorka 1 (gore)

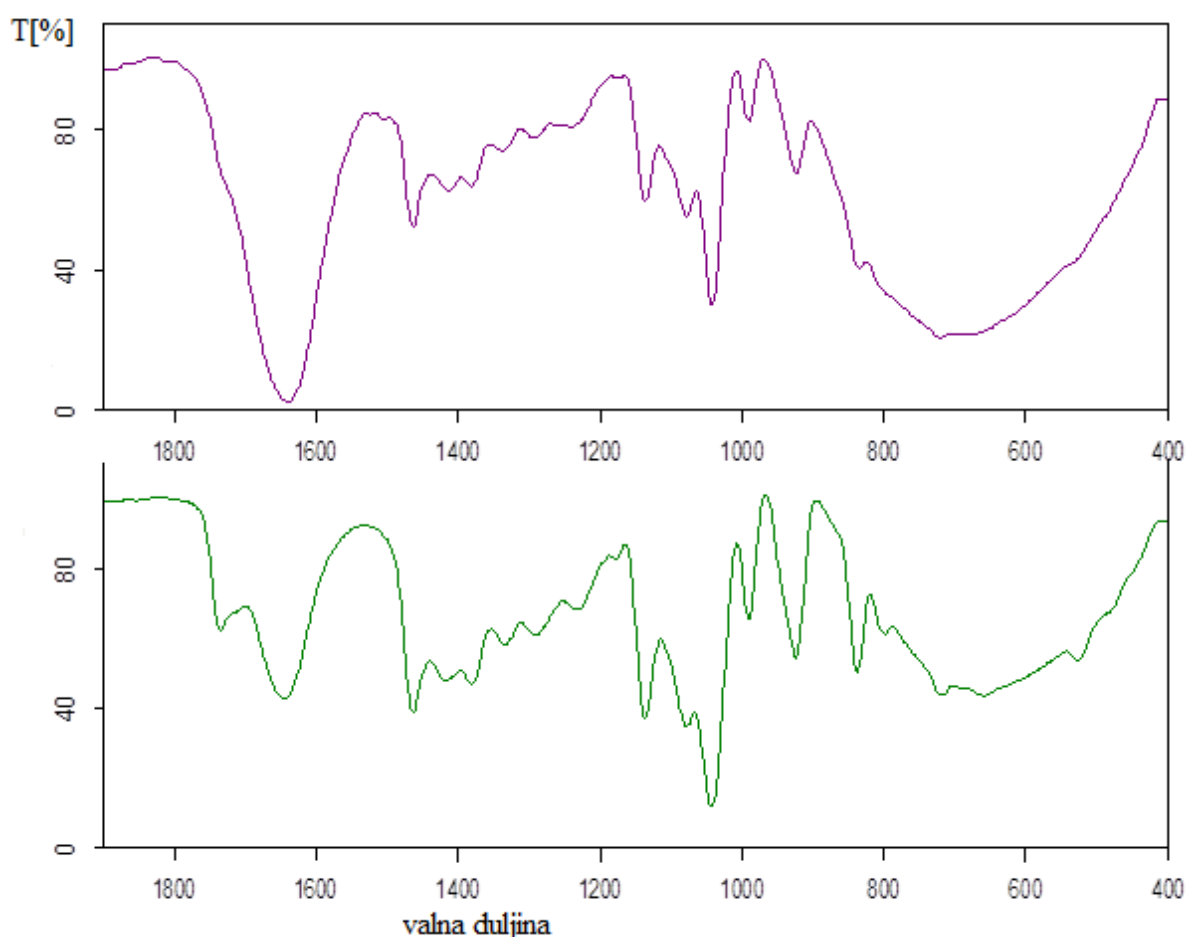
Elocom krema kao aktivnu komponentu sadrži mometazon furoat. To je spoj čija je struktura prikazana na slici 16,



Slika 16. Struktura Mometazon furoata

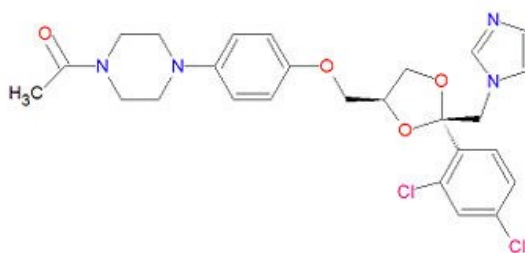
§ 4. Rezultati i rasprava

sustavnog imena (11 β ,16 α)-9,21-dikloro-11-hidroksi-16-metil-3,20-dioksopregna-1,4-dien-17-il 2-furoat. Mometazon furoat je sintetički steroidni hormon iz glukokortikoidne skupine steroidnih hormona. To je bijeli ili prljavo bijeli prah, skoro netopljiv u vodi, slabo topljiv u oktanolu i umjereno topljiv u etanolu. Goyal i suradnici⁹ asignirali su sljedeće karakteristične vrpce za mometazon furoat: 3430 cm⁻¹ (istežanje O–H) 2938 i 2886 cm⁻¹ (istežanje C–H), 1726 cm⁻¹ (istežanje C=O), 1658 cm⁻¹ (istežanje C=O u cikličkom sustavu), 1610 cm⁻¹ (acikličko istežanje C=O), 1468 cm⁻¹ i 1393 cm⁻¹ (deformacije C–H) i 1026 cm⁻¹ (istežanje C–O).



Slika 17. Infracrveni spektri uzorka 1 (dolje) i Oronazola (gore)

Oronazol sadrži kao aktivnu komponentu ketokonazol. To je antimikotik kemijske formule $C_{26}H_{28}Cl_2N_4O_4$, a molarne mase $531,43 \text{ g mol}^{-1}$, čija je aktivnost temeljena na azolu, tj imidazolu. Sadrži i piperazinski prsten, a struktura je prikazan na slici 18.



Slika 18. Struktura Ketokonazola

Kemijski naziv mu je 1-[4-[4-[[2-(2,4-diklorofenil)-2-(imidazol-1-ilmetil)-1,3-dioksolan-4-il]metoksi]fenil]piperazin-1-il]etanon.

Pandeewaran i suradnici ¹⁹ asignirali su sljedeće karakteristične vrpce : $1646s \nu(O=C-CH_3)$; $1586w \nu(C=C)$, $\nu(C=N)$; $1372w \nu(C-N)$; $1244s$, $1041m \nu(C-O-C)$; $816s \nu(C-Cl)$; (oznake: s, jaka; m, srednje jaka ; w, slaba; ν , istezanje).

Aloe Vera je jedna od najčešće upotrebljivanih biljaka u dermatologiji i kozmetici. Glavni sastojci koje sadrži su polisaharidi, glikoproteini i fenolni spojevi. Nejatadeh-Barandozi i suradnici ¹⁰ asignirali su spektar IR lista Aloe Vere. Karakteristične apsorpcijske vrpce pojavljuju se pri 2852 cm^{-1} , 2925 cm^{-1} , 1630 cm^{-1} , 2852 cm^{-1} , 1420 cm^{-1} , 1319 cm^{-1} , 1245 cm^{-1} , 1100 cm^{-1} , 780 cm^{-1} i 465 cm^{-1} . Vrpce pri približno 3300 cm^{-1} mogu se pripisati prisutnosti vodikovih veza u kojima sudjeluje skupina N-H, što je karakteristično za aminokiseline. Apsorpcijske vrpce pri $2900-2850 \text{ cm}^{-1}$ pripadaju simetričnom i asimetričnom istezanju skupina CH_2 a karakteristične su i za prisutnost alifatskih skupina $-CH$. Apsorpcijska vrpca pri $1750-1655 \text{ cm}^{-1}$ karakteristična je za istezanje veze $C=O$ te indicira prisutnost karbonilnih skupina. Snažna apsorpcijska vrpca pri $1620-1610 \text{ cm}^{-1}$ odgovara istezanju veze $C=C$ što upućuje na postojanje vinilnog etera i aloinskog spoja. Vrpca jakog intenziteta pri 1637 cm^{-1} karakteristična je za aminokiseline, a druga srednje jaka vrpca pri 1419 cm^{-1} također može pripadati aminokiselinama.

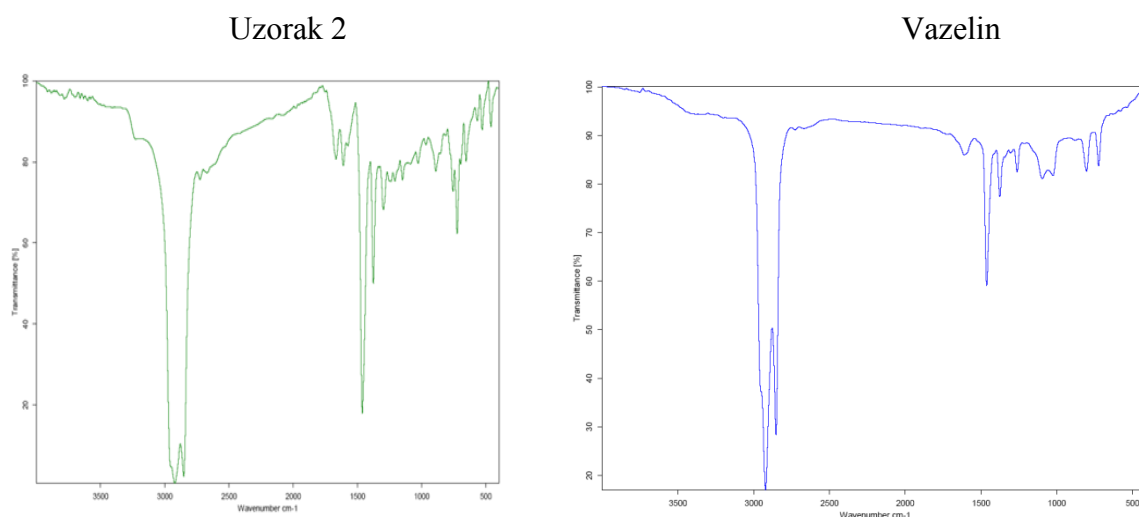
Apsorpcijska vrpca u području $1360\text{--}1320\text{ cm}^{-1}$ pripada simetričnom istezanju NO_2 u aromatskim nitro spojevima. Vrpca pri 1240 cm^{-1} odnosi se na vibracije istezanja C–O skupina u esterima i fenolima. Vrpca u području $1160\text{--}1100\text{ cm}^{-1}$ odgovara istezanju veze C=S.

Apsorpcijska vrpca pri 780 cm^{-1} karakterizira izvanravninsku deformaciju skupine C–H. Apsorpcija u području $1530\text{--}1450\text{ cm}^{-1}$ odgovara antisimetričnom istezanju skupine N=N–O.

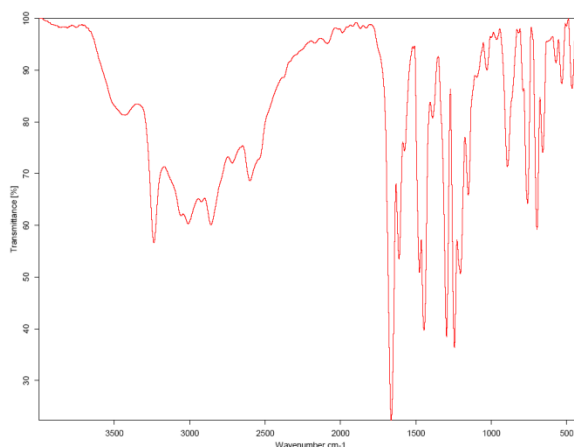
Na temelju snimljenih spektara IR uzorka 1 i komercijalno dostupnih krema i masti ne može se zaključiti koja je aktivna komponenta zastupljena u uzorku 1. Mogućnosti se mogu suziti na tri tipa spojeva: kortikosteroidi, aktivni derivati imidazola i niz spojeva sadržanih u prirodnom sustavu biljke *Aloe Vera*.

Analiza uzorka 2 bila je znatno jednostavnija od analize uzorka 1.

Asigniranjem infracrvenog spektra uzorka 2, ustanovljeno je da je matrica vazelin, a aktivna komponenta salicilna kiselina.



Salicilna kiselina

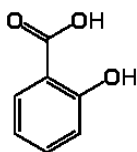


Slika 19. Infracrveni spektri uzorka 2, vazelina i salicilne kiseline

Promatranjem infracrvenih spektara vazelina i uzorka 2 uočene su karakteristične vrpce koje se poklapaju. Vrpca opažena pri 3000 cm^{-1} arakteristična je za istezanje veze C–H u alifatskim skupinama. Vrpca opažena pri 1470 cm^{-1} može se pripisati savijanju veze C–H, a ona pri 720 cm^{-1} pripada skupini CH_2 .

Potrebno je promatrati spektar u tzv.području otiska prsta, jer su u tom dijelu uočene karakteristične vrpce koje se mogu pripisati uzorku 1 i salicilnoj kiseline. Vrpce opažene pri 1600 cm^{-1} pripadaju višim harmonicima aromatskih spojeva dok one opažene pri 1470 , 1380 , 720 cm^{-1} odgovaraju svijanjima veze C–H.

Salicilna kiselina (latinski *Salix* – vrba, iz čije se kore dobivala) je monohidroksibenzojeva kiselina. Ta se bezbojna kristalična organska kiselina široko upotrebljava, posebice u medicini i kozmetičkoj industriji, a struktura je prikazana na slici 20. Sustavni IUPAC-ov naziv je 2-hidroksibenzojeva kiselina.



Slika 20. Struktura salicilne kiseline

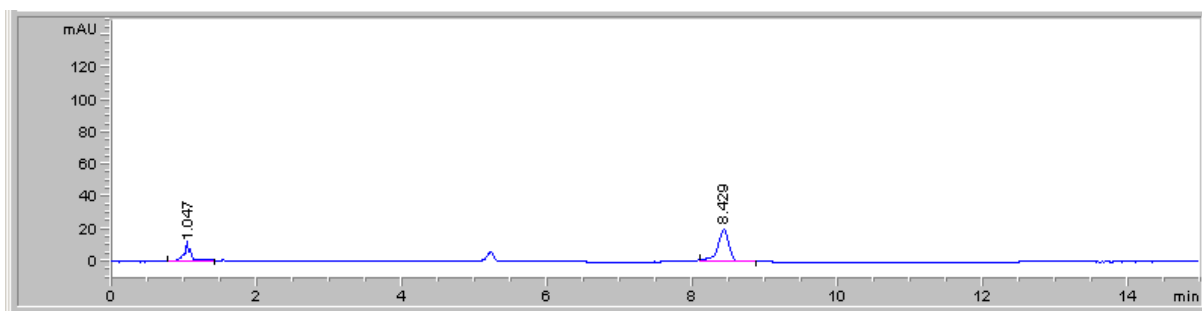
Molekulska formula je $C_7H_6O_3$ a molarna masa $138.12 \text{ g mol}^{-1}$.

Iz spektara koji su prikazani na slici 19 možemo zaključiti da u uzorku 1 dominira vazelin, dok je aktivna komponenta najvjerojatnije salicilna kiselina.

Podaci dobiveni spektroskopijom IR pokazali su da je matrica uzorka 1 belobaza, a matrica uzorka 2 vazelin. Kako bismo identificirali aktivnu komponentu u uzorku 1 provedena je analiza tekućinskom kromatografijom visoke djelotvornosti obrnutih faza nepoznatih uzoraka masti i krema, te komercijalno dostupnih masti i krema.

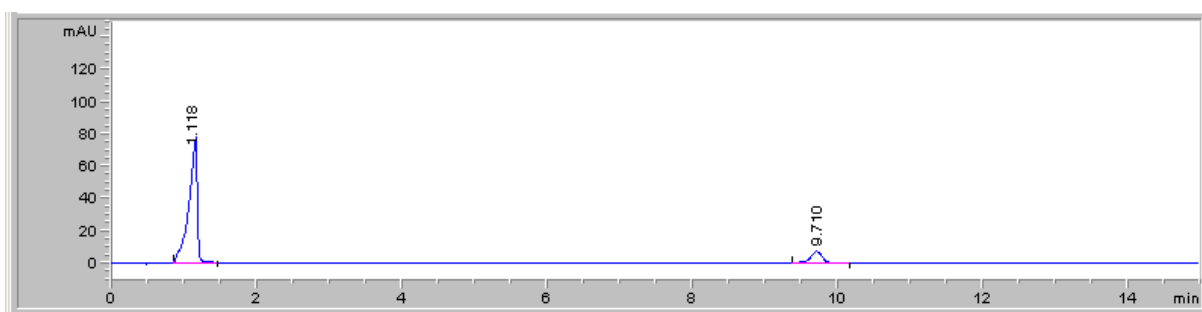
4.2. Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti obrnutih faza, RP-HPLC

Analizirani su uzorci komercijalno dostupnih krema i masti koji sadrže kortikosteroid kao aktivnu tvar i salicilnu kiselinu u svrhu utvrđivanja istih u nepoznatim uzorcima. Snimljeni su uzorci Belosalica, Ornazola, Afloderma i Elocoma. Svi uzorci kao pomoćnu tvar sadrže vazelin. Korištena je metoda tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti obrnutih faza. Odabran je sustav otapala za mobilnu fazu sa ciljem što boljeg odvajanja komponenti.

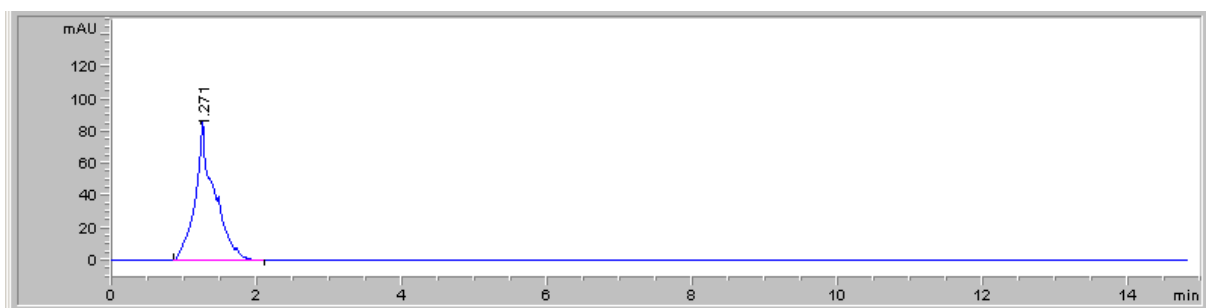


Slika 21. Kromatogram uzorka Afloderma

Pik retencijskog vremena pri 8,429 min pripada alkometazonu kao što je prikazano na slici 21.

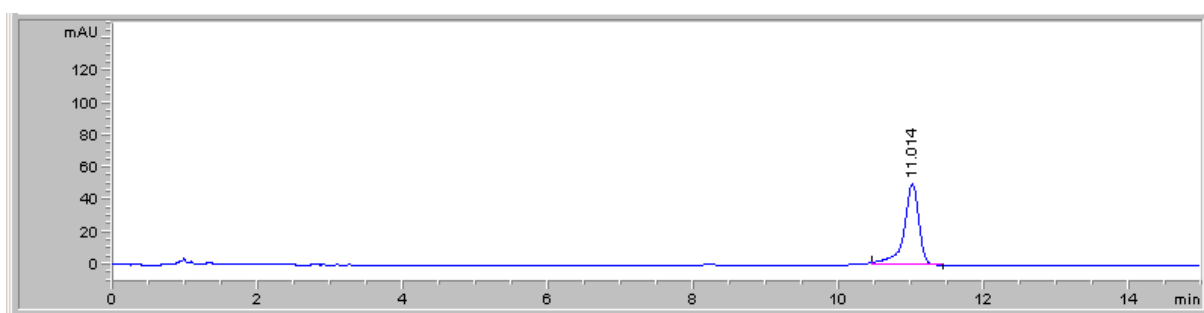


Slika 22. Kromatogram Belosalic kreme



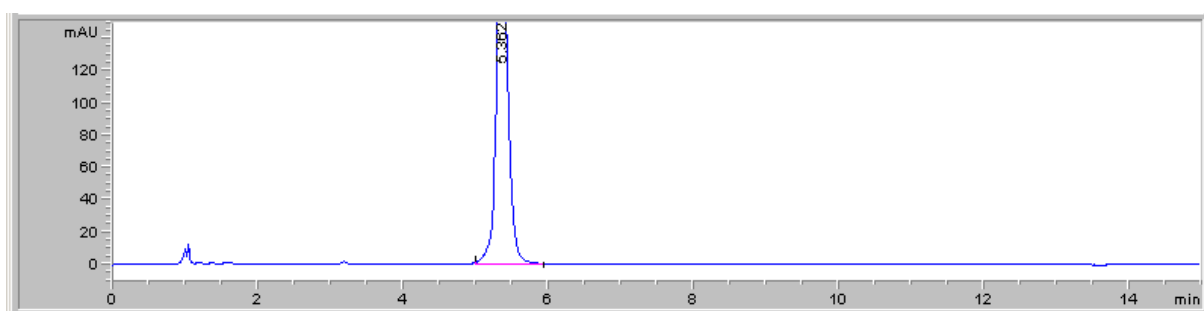
Slika 23. Kromatogram salicilne kiseline

Na kromatogramu uzorka Belosalic, slika 22, mogu se uočiti dva pika, jedan pri retencijskom vremenu od 1,118 min koji odgovara salicilnoj kiselini, što se može potvrditi kromatogramom na slici 23. Pik pri 9,710 minuti odgovara aktivnoj komponenti betametazonu.



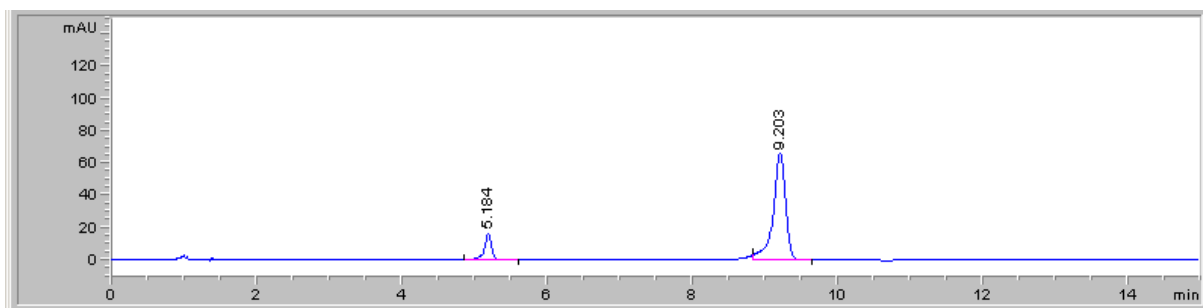
Slika 24. Kromatogram Elocoma

U kromatogramu elocoma uočen je jedan pik retencijskog vremena 11,014 min koji odgovara mometazon fluoratu.



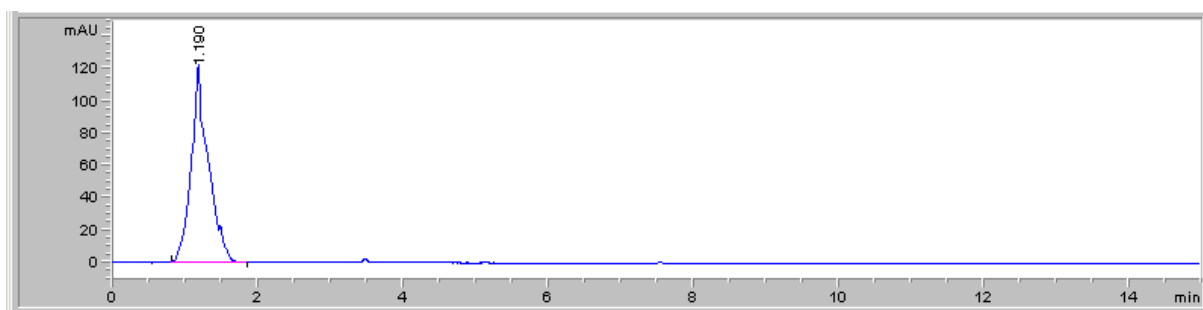
Slika 25. Kromatogram Oronazola

Pik koji se pojavljuje na 5,367 minuti može se pripisati ketokonazolu.

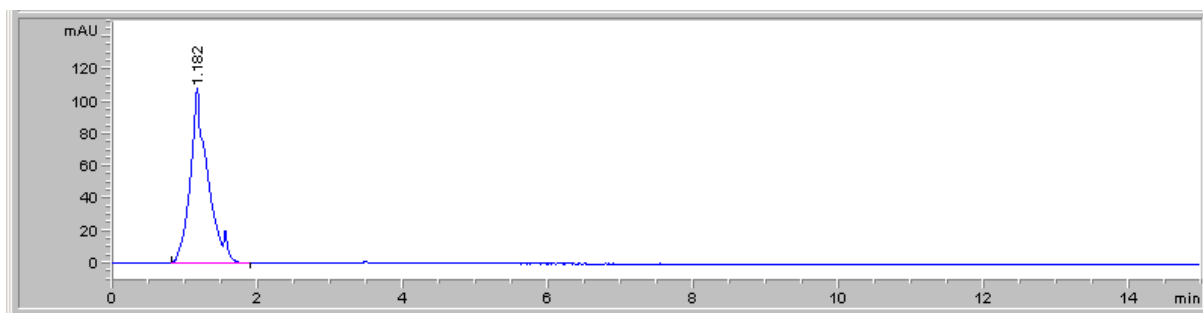


Slika 26. Kromatogram uzorka 1

U kromatogramu uzorka 1 uočena su dva pika, jedan pri 9,203 min čije je retencijsko vrijeme slično onome za betametazon. Kromatografski pik pri 5,184 min se ne poklapa niti s jednom aktivnom komponentom analiziranih komercijalnih uzoraka.



Slika 27. Kromatogram uzorka 2



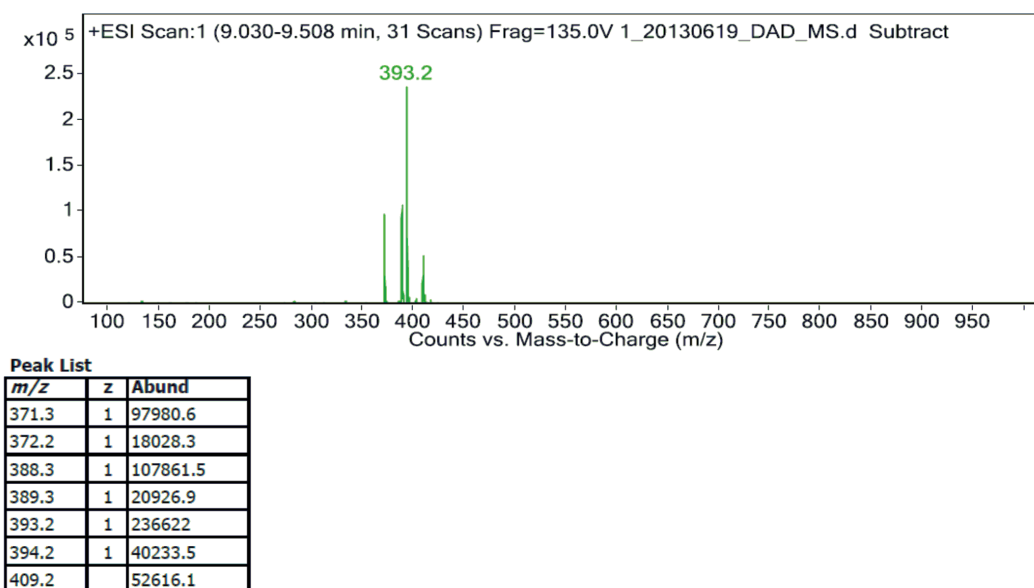
Slika 28. Kromatogram uzorka 2 s dodatkom salicilne kiseline

Prema kromatogramima prikazanim na slikama 27 i 28, možemo zaključiti da uzorak 2 sadrži salicilnu kiselinu.

Tekućinskom kromatografijom visoke djelotvornosti obrnutih faza određena su retencijska vremena određenih tipova kortikosteroida. Za uzorak 2 utvrđena je prisutnost salicilne kiseline, ali ne i prisutnost kortikosteroida. U uzorku 1 potvrđena je prisutnost kortikosteroida betametazona. Na temelju RP-HPLC analize može se procijeniti da 1g nepoznatog uzorka 1 sadržava između 0,70 i 2 mg betametazona, te da u uzorku 2 udio salicilne kiseline može biti u rasponu od 12-20 mg po 1 g kreme.

4.3. Metoda LC-MS

Kako bismo potvrdili rezultate dobivene u prethodnim mjerenjima koristili smo i spregnutu metodu tekućinska kromatografija-spektrometrija masa, LC-MS. Analizom LC-MS spektara uzorka 1 utvrđeno je da postoji pik LC u području 9,030-9,508 min čiji molekularni ion pri $m/z=393$ odgovara kortikosteroidu betametazonu. Na ovaj način potvrdili smo njegovu prisutnost u uzorku 1.

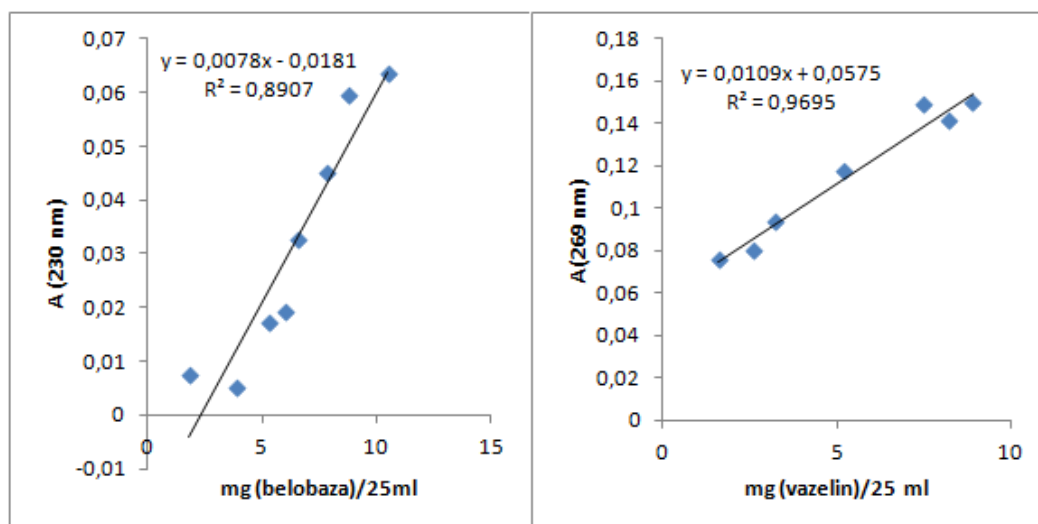


Slika 29. Spektar masa uzorka 1 (LC pik pri 9,030-9,508 min)

4.4. Spektrometrija u UV području

Snimljeni su spektri UV za uzorke vazelina i belobaze i uspoređeni s onima za uzorke 1 i 2 u 1-propanolu

Usporedbom spektara UV uzoraka 1 i 2 sa spektrima belobaze i vazelina moglo se zaključiti da je nosiva baza u uzorku 1 belobaza, a u uzorku 2 vazelin. Promjena apsorbancije s promjenom mase matrice otvara mogućnost za određivanje sadržaja matrice u uzorku.



Slika 30. Ovisnost apsorbancije o promjeni mase matrice

Iz slike 30. vidljiva je linearna ovisnost apsorbancije o koncentraciji matrice.

§ 5. ZAKLJUČAK

Istraživanje u sklopu ovog diplomskog rada pokazalo je da su infracrvena spektroskopija i kromatografija HPLC prigodne metode za analizu farmaceutskih pripravaka nepoznatog sastava. Na temelju usporedbe kromatograma te spektara i asignacije karakterističnih vibracijskih vrpca i kromatografskih pikova, može se zaključiti da je nosiva tvar u uzorku 1 belobaza, a u uzorku 2 vazelin. Daljnjom analizom IR spektara i kromatograma može se identificirati aktivna komponenta u uzorku 2, a to je salicilna kiselina. Najveća sličnost spektara IR uzorka 1 i komercijalnih pripravaka bila je sa spektrom afloderm kreme koja sadrži alkometazon. Međutim, na temelju usporedbe kromatograma HPLC uzorka 1 i komercijalnih uzoraka može se pretpostaviti da je betametazon jedna od aktivnih komponenti. Analiza spektra LC-MS potvrdila je postojanje ovog kortikosteroida u uzorku 1. Spektrometrija UV pokazala se kao dobra metoda za kvantitativno određivanje nosivih baza u uzorcima.

§ 6. POPIS OZNAKA, KRATICA I SIMBOLA

A –apsorbancija

ASK – acetilsalicilna kiselina

b -duljina puta zračenja

BSA –eng. *Body surface area*

c – množinska koncentracija

DQLI – eng. *Dermatological quality of life index*

*D*₀ – energija disocijacije

*D*_{eq} – ravnotežna energija disocijacije

FT- Fourierova transformacija

GC – plinska kromatografija

HPLC – tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti

IR – infracrvena spektroskopija

LC- tekućinska kromatografija

N-broj prostornih koordinata

NSAR-nesteroidni protuupalni lijekovi

PASI –eng.*Psoriasis Security Area Index*

*r*_{eq}- ravnotežna udaljenost atoma

RP-HPLC- tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti obrnutih faza

UV- spektroskopija u ultraljubičastom području

UV-VIS – spektroskopija u ultraljubičastom i vidljivom području

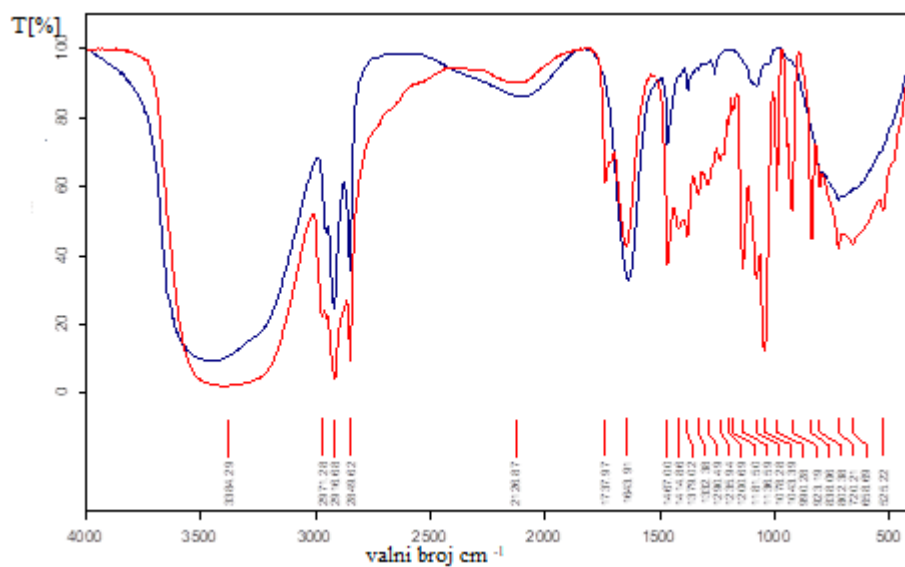
ϵ - molarni apsorpcijski koeficijent

§ 7. LITERATURNI IZVORI

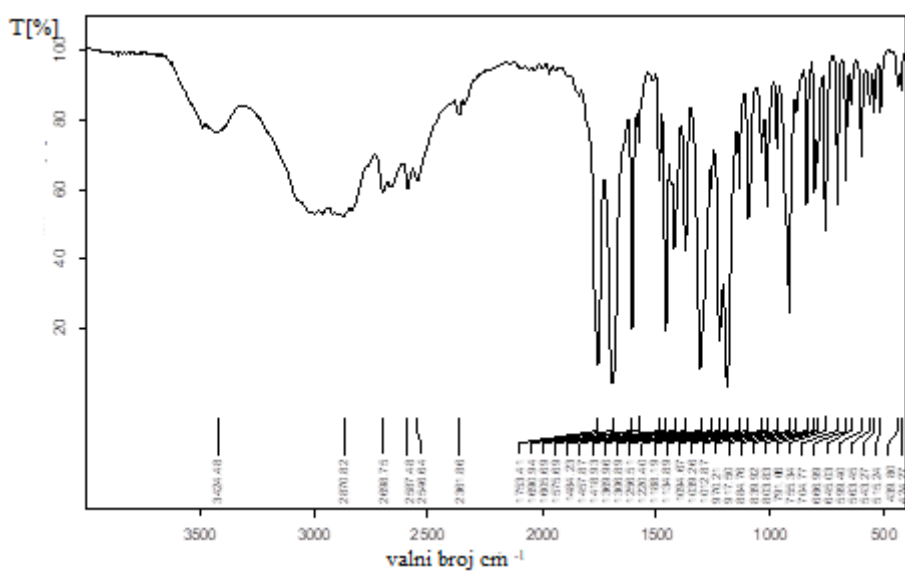
1. P. Novak, T. Jednačak, *Strukturna Analiza Spojeva Spektroskopskim Metodama*, Tiva Tiskara Varaždin, Varaždin 2013, str.63–77.
2. H. Günzler, H.U. Gremlich, *Uvod u infracrvenu spektroskopiju*, Školska knjiga, Zagreb 2006, str. 21, str. 241.
3. N. Galić, *Spektroskopija masa* (interna skripta), Prirodoslovno-matematički fakultet, Zagreb 2004.
4. M. Kaštelan, *Reumatizam*, **64** (2017) str.31–36.
5. S. M. Matanović, *Medicus* **23** (2014) str. 31-46.
6. I.Varga, Đ.B.Luburić, B.S.Kolanović, I.Varenina, N.Bilandžić, *Veterinarska stanica* **49** (6) (2018) 413–422.
7. M.Bojić, *Farmaceutski glasnik* **71** (2015) 529–535.
8. Y.Yamamoto, T.Fukami, T.Koide, T.Suzuki, Y.Hiyama, K.Tomono, *Int. J. Pharm.* **426** (2012) 54–60.
9. R.N.Goyal, D.Kaur, B.Agrawal, S.K.Yadav, *J. Electroanal. Chem.* **695** (2013) 17–23.
10. F.Nejatzadeh-Barandozi, S.T.Enferadi, *Org. Med. Chem. Letters* (2012), 2–33.
11. A. Menter, M. D. Chair, N. J. Korman, C. A. Elments, S. R. Feldmen, J. Y. M. Koo, M. Lebwohl, H. W. Lim, A. S. Van Voorhees, K. R. Beutner, R. Bhushan, *J. Am. Acad. Dermatol.* (2011) 138–168.
12. D. A. Skoog, D. M. West, F. J. Holler, *Osnove Analitičke Kemije*, Školska knjiga Zagreb,1999, str.547–569.
13. M. E. A de Jager, M. G. J de Jong, P. C. M van de Kerkhof, M. B. Seyger, *J. Am. Acad. Dermatol.* **62** (2010) 1013–1030.
14. T. R. M. De Beer, W. R. G. Baeyens, Y. Vander Heyden, J. P. Remon, *Eur. J. Pharm. Sci.* (2007). 230–234.
15. L. C. Strowd, B. A. Yentzer, A. B. Fleischer, S. R. Feldmedn, *J. Am. Acad. Dermatol.* **60** (3) (2008) 478-481.
16. C. O. Mendonça, A. D. Burden, *Pharmacol. Ther.* **99** (3) (2003) 133-147.
17. M. E. Capella-Peiró, M. Gil-Agusti, L. Monferrer-Pons, J. Esteve-Romero, *Anal. Chim. Acta* **454**, (2002) 125–135

18. M. Kaštelan, L. P. Massari, *Med. Jad.* **37** (3–4) (2005) 73-75.
19. A. M. Krüger, K. Radtke, I. Schwipl, K. Reich, *Dermatology* (2008) 366–372.
20. V. Barišić-Druško, D. Paljan, A. Kinsky, S. Vujasinović, *Acta Derm. Venereol* **146** (1989) 178–179.
21. <https://www.wikipedia.org/> (datum pristupa 6. veljače.2019.).
22. S. Ravi, P. Kabilar, S. Velmurugan, R. A. Kumar, M. Ayathiri, *J. Exp. Sci.* **2** (8) (2011) 10–13.
23. L. Čabrijan, T. Kehler, *Acta Med. Croat.* **69** (2015) 59–63.
24. W.H. Boehncke, *Rheum. Dis. Clin. North Am*, **41** (4) (2015) 665–675.

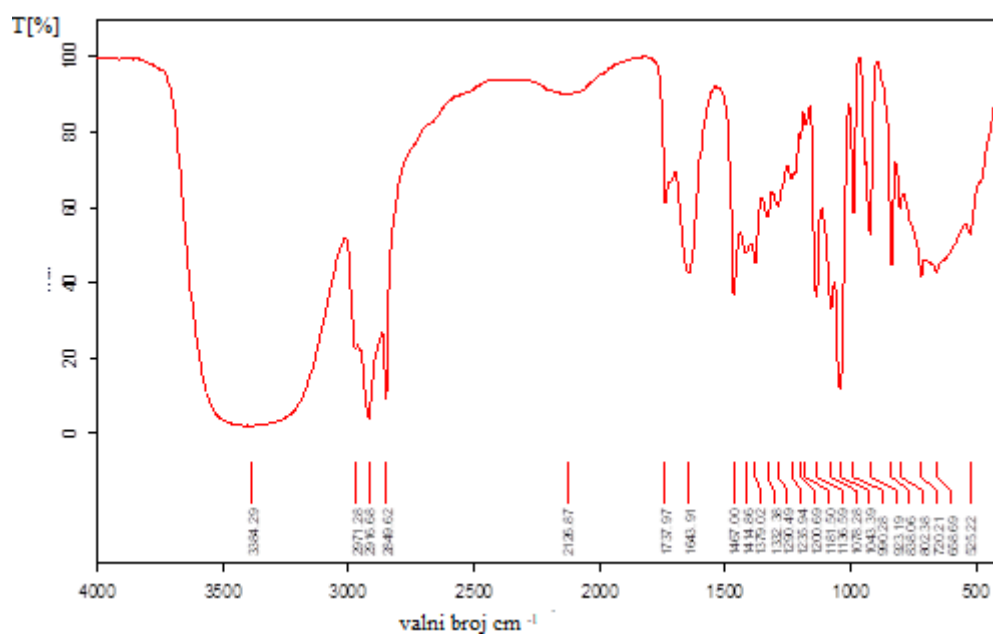
§ 8. DODATAK



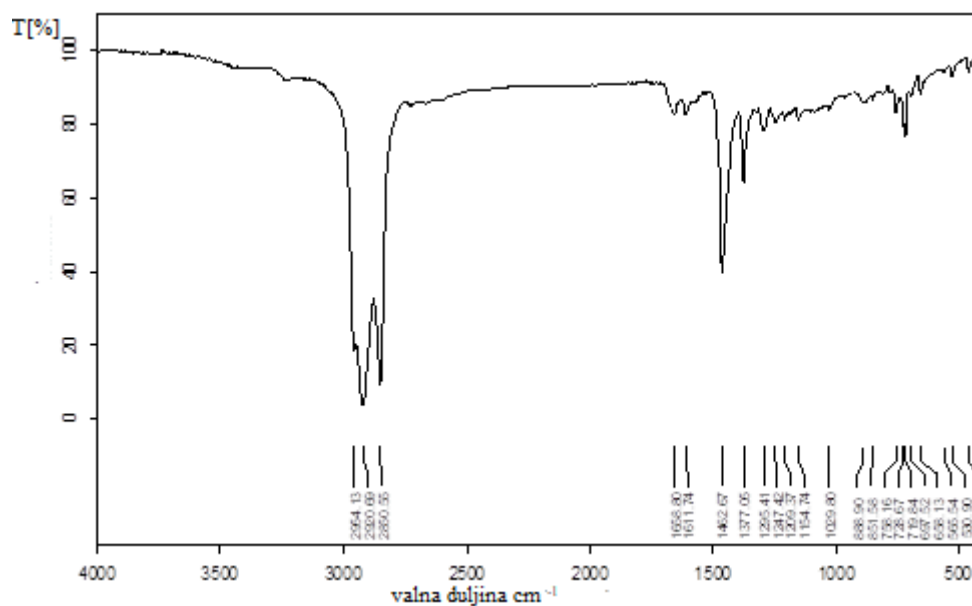
Slika D1. IR spektar belobaze



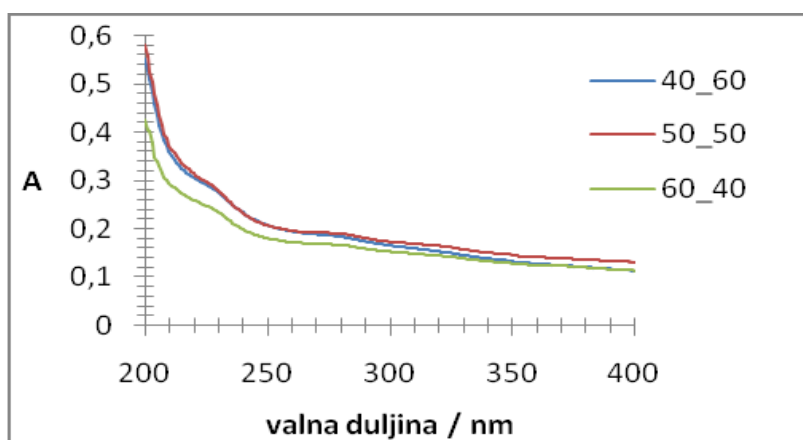
Slika D2. IR spektar acetilsalicilne kiseline



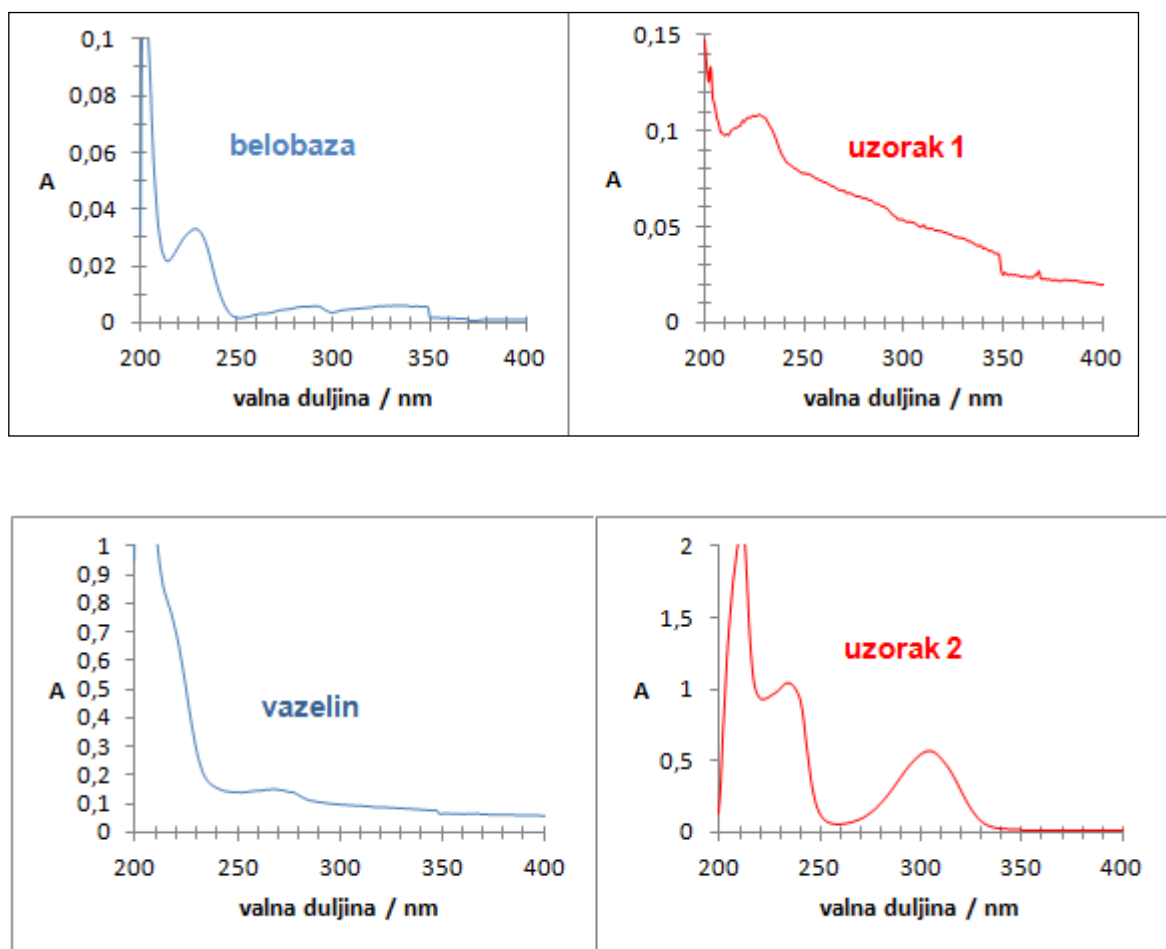
Slika D3. IR spektar uzorka 1



Slika D4. IR spektar uzorka 2



Slika D5. UV spektri belobaze otopljene u smjesama acetonitrila i vode



Slika D6. UV spektri uzorka 1 i 2, belobaze i vazelina

§ 9. ŽIVOTOPIS

Osobni podatci

Ime i prezime: Vida Petrušić

Datum rođenja: 19. lipanj 1981.

Mjesto rođenja: Zagreb

Obrazovanje

1995. Osnovna škola Antuna Branka Šimića, Zagreb

1999. Zdravstveno Učilište, Zagreb

2014. Preddiplomski studij, Prirodoslovno-matematički fakultet , Sveučilište u
Zagrebu